PRIMÄRSTRUKTUR DER HÄMOGLOBINE VON GRAUGANS (ANSER ANSER), STREIFENGANS (ANSER INDICUS) UND STRAUSS (STRUTHIO CAMELUS).

EIN BEITRAG ZUR EVOLUTION UND PHYSIOLOGIE (HOCHLANDATMUNG) DER VÖGEL

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Walter Oberthür

aus Erlangen

1980

PRIMÄRSTRUKTUR DER HÄMOGLOBINE VON GRAUGANS (ANSER ANSER), STREIFENGANS (ANSER INDICUS) UND STRAUSS (STRUTHIO CAMELUS).

EIN BEITRAG ZUR EVOLUTION UND PHYSIOLOGIE (HOCHLANDATMUNG) DER VÖGEL

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WALTER OBERTHÜR

aus Erlangen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 5. Mai 1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Voelter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P. Hagenmaier

Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

A B S T R A C T

OBERTHÜR, WALTER:

PRIMÄRSTRKTUR DER HÄMOGLOBINE VON GRAUGANS (ANSER ANSER), STREIFENGANS (ANSER INDICUS) UND STRAUSS (STRUTHIO CAMELUS). EIN BEITRAG ZUR EVOLUTION UND PHYSIOLOGIE (HOCHLANDATMUNG) DER VÖGEL.

Die Primärstrukturen der Hämoglobine (Hauptkomponente) der Graugans (Anser anser), Streifengans (Anser indicus) und des Straußes (Struthio camelus) wurden vollständig aufgeklärt, die der Hausgans teilweise. Die Ketten der Hauptkomponenten konnten ohne vorherige Abtrennung der Nebenkomponenten aus nativem Globin in einem dafür entwickelten Puffer- und Gradientensystem mit Austauschchromatographie über CM-Cellulose gewonnen werden. Die Sequenz jeder Kette wurde mit unterschiedlichen Spaltungs- und Isolierungsmethoden erarbeitet, um einen generellen Weg zur Aufklärung der Primärstruktur der Vogelhämoglobine zu finden. Da die heutige Technik die Sequenzierung großer Peptide ermöglicht, wurde die Spaltung in kleine Bruchstücke nur beschränkt angewendet. Auf chymotryptische und peptische Peptide konnte ganz verzichtet werden.

Die Ketten wurden homolog verglichen und die Unterschiede diskutiert. Dabei überrascht die signifikant unterschiedliche Mutationsrate der α- und β-Ketten. Nach Korrelation mit paläontologischen Daten kann den α-Ketten eine annähernd normale, den β-Ketten dagegen eine stark reduzierte (Faktor 3-4) Mutationsrate zugeschrieben werden. Dies steht im Gegensatz zu heutigen Erkenntnissen und Daten. Genetische Distanzen und der Stammbaum der Vögel wurden anhand der Primärstrukturen bestimmt. Auf Zusammenhänge zwischen Primärstrukturen und Atemphysiologie der Vögel, insbesondere der Rolle des Phosphats, wird eingegangen. Die Höhenatmung der Streifengans wird mit dem Austausch α63 (E12) Val und der damit verbundenen Tertiär- und Quartärstrukturänderungen molekular gedeutet.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Braunitzer und am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. W. Voelter von Mai 1977 bis November 1979 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer und Herrn Prof. Dr. W. Voelter danke ich für großzügige Unterstützung und Förderung, sehr guten Arbeitsbedingungen, ständig fruchtbare Anleitung und Diskussion.

Mein Dank gilt ferner Prof. Dr. P.G. Wright, Witwatersrand, für das Straußenblut, Dr. M.F. Perutz, Prof. Dr. C. Bauer, Regensburg, und Prof. Dr. I. Würdinger, Hannover, für wertvolle Diskussion und Anregungen, Dr. S. Kallas, Grünau, für Blutproben von Graugänsen, Dr. J. Lamprecht und H. Buhrow, Seewiesen, für das Geschenk eines Grauganspaares und Dr. M. Hornberger, Martinsried, für die Entnahme der Blutproben.

Darüberhinaus danke ich allen Angehörigen der Abteilungen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und meiner Tätigkeit Verständnis entgegenbrachten.

Insbesondere erwähne ich Herrn A. Stangl, der mich in die Methoden der Peptidtrennung einführte.

Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danke ich Herrn H. Bauer, Herrn A. Stangl und Fräulein C. Mayr.

Weiterhin danke ich Fräulein B. Schrank, Herrn C. Krombach und Fräulein H. Mairhofer für technische Hilfe und Fräulein Dr. T. Kleinschmidt für die Durchsicht der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	PROBLEM DER HÖHENATMUNG	2
3.	CHARAKTERISIERUNG DER HÄMOGLOBINE	4
	3.1 Elektrophorese	4
	3.2 Chromatographie	7
4.	TRENNUNG DER KETTEN	7
	4.1 Trennung durch Gegenstromverteilung	9
	4.2 Kettentrennung mit CM-Cellulose	9
5.	ANALYTISCHE REINHEITSPRÜFUNG DER α- und β-Ketten	12
	5.1 Elektrophorese	12
	5.2 Bruttoformeln der Ketten	13
	5.3 N-terminale Sequenzen	13
	5.3.1 Übersicht des Abbaus der Ketten	13
	5.3.2 Sequenzanalyse	16
6.	SPALTUNG DER KETTEN, ISOLIERUNG UND DIE SEQUENZ DER PEPTIDE	18
	6.1 Hausgans, α-Ketten	18
	6.1.1 Bromcyanpeptide	18
	6.1.1.1 Bruttoformeln	19
	6.1.1.2 Sequenz von CBpII	2o
	6.1.1.3 Sequenz von CBpI	2o
	6.2 Hausgans, β-Ketten	2o
	6.2.1 Bromcyanpeptide	2o
	6.2.1.1 Sequenz von CBpII	22
	6.2.1.2 Bruttoformeln	22
	6.2.2 Arginylpeptide	23
	6.2.2.1 Bruttoformel von Ap3	24
	6.2.2.2 Sequenz von Ap3	24
	6.3 Zusammenfassung, Hausgans	25
	6.3.1 Sequenzierschema des Hämoglobins der Hausgans	25
	6.4 Graugans, α-Ketten	26
	6.4.1 Bromcyanpeptide	26
	6.4.1.1 Sequenzanalyse von CBpII	26
	6.4.1.2 Bruttoformeln	27

Seite

6.4.2 Tryptische Peptide 28
6.4.2.1 Löslicher Anteil, Gelchromatographie 28
6.4.2.2 "Core"-Anteil, Gelchromatographie 28
6.4.2.3 Rechromatographie über Dowex5o der löslichen tryptischen Peptide 28
6.4.2.4 Sequenz der tryptischen Peptide 32

6.4.3 ASP-PRO-Peptide 33
6.4.3.1 Sequenzanalyse von APpII 33
6.4.3.2 Bruttoformeln 34

6.4.4 Nachspaltung von APpII mit Protease Aureus V8 36
6.4.4.1 Bruttoformeln 36
6.4.4.2 Sequenzanalyse von APpIIGpII 38

6.5 Graugans,ß-Ketten 39

6.5.1 Bromcyanpeptide 39
6.5.1.1 Bruttoformel von CBpII 39
6.5.1.2 Sequenzanalyse von CBpII 39

6.5.2 Tryptische Peptide 4o
6.5.2.1 Gelchromatographie, löslicher Anteil 4o
6.5.2.1.1 Bruttoformeln 43
6.5.2.1.2 Sequenzanalysen 43
6.5.2.2 Gelchromatographie, "Core"-Anteil 44
6.5.2.2.1 Sequenz von Tp12/13 44
6.5.2.2.2 Bruttoformel von Tp12/13 45
6.5.2.3 Rechromatographie über Dowex5o und Sequenz der isolierten Peptide 45

6.5.3 Arginylpeptide 48
6.5.3.1 Sequenzanalysen 51

6.6 Zusammenfassung, Graugans 52

6.6.1 Übersicht der Sequenzanalyse 53

6.7 Streifengans, α-Ketten 54

6.7.1 Bromcyanpeptide 54
6.7.1.1 Bruttoformel von CBpII 54
6.7.1.2 Sequenz von CBpII 54

6.7.2 Tryptische Peptide 55
6.7.2.1 Rechromatographie über Dowex5o 55

6.7.3 ASP-PRO-Peptide 55
6.7.3.1 Bruttoformel von APpII 58
6.7.3.2 Sequenz von APpII 58

Seite

6.8 Streifengans, ß-Ketten 58

6.8.1 Bromcyanpeptide 58

6.8.2 Tryptische Peptide 59

6.8.3 Arginylpeptide 59

6.9 Zusammenfassung, Streifengans 65

6.9.1 Übersicht der Sequenzanalyse 66

6.1o Strauß, α-Ketten 67

6.1o.1 Tryptische Peptide 66
6.1o.1.1 Rechromatographie über Dowex5o 68
6.1o.1.2 Sequenz der Peptide 68

6.1o.2 ASP-PRO-Peptide 71
6.1o.2.1 Bruttoformel von APpII 71
6.1o.2.2 Sequenz von APpII 71

6.11 Strauß, ß-Ketten 72

6.11.1 Bromcyanpeptide 72
6.11.1.1 Sequenz von CBpII 72

6.11.2 Tryptische Peptide 73
6.11.2.1 Rechromatographie über Dowex5o 76
6.11.2.1 Isolierung von Tp1o/11 76
6.11.2.3 Sequenz der Peptide 76

6.11.3 ASP-PRO-Peptide 8o
6.11.3.1 Sequenz von APpII 81
6.11.3.2 Bruttoformel von APpII 82

6.12 Zusammenfassung, Strauß 82

6.12.1 Übersicht der Sequenzanalyse 83

7. TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER VOLLSTÄNDIGEN PRIMÄRSTRUKTUREN DER HIER ERARBEITETEN VOGELHÄMOGLOBINE UND IHRE UNTERSCHIEDE 84

7.1 Primärstrukturen 84

7.2 Unterschiede in der Primärstruktur. Position und Funktion der ausgetauschten Reste 84

8. DISKUSSION 93

8.1 Homologer Vergleich der Primärstrukturen 93

8.1.1 Graugans-Streifengans 93

8.1.2 Strauß-Gänse 93

Seite

8.1.3 Vergleich mit anderen Hämoglobinen 94
8.1.3.1 "Belgische" Graugans, α-Ketten 94
8.1.3.2 Hauptkomponenten vom Huhn (AI und AII) 95
8.1.3.3 Vögel-menschliches Hämoglobin 96

8.2 Evolution, Systematik und Molekularbiologie 97

8.2.1 Hämoglobin in der Paläogenetik 98
8.2.2 Zur Evolution der Vögel 99

8.3 Aussagen zur Evolution der Vogelhämoglobine anhand eigener Sequenzdaten 1oo

8.3.1 Ungleiche Evolution der α- und ß-Ketten 1oo
8.3.2 Genetische Distanzen und Stammbaum 1o1
8.3.3 Mutationsraten und Datierung der Vorfahren 1o3
8.3.4 Deutung der reduzierten Mutationsrate der ß-Ketten 1o4
8.3.5 Die ß-Ketten der Vögel ein Fossil? 1o5

8.4 Atmungsphysiologie der Vögel 1o5

8.4.1 Atmung bei Hochlandvögeln 1o6
8.4.2 Phosphatbindungsstellen 1o7
8.4.3 Molekulare Deutung der Hochlandatmung der Streifengans 1o8
8.4.4 Hypoxietoleranz, Phosphatbindungsstellen und Primärstruktur 1o8

9. MATERIAL UND METHODEN 1o9

9.1 Gewinnung von Globin 1o9

9.1.1 Isolierung des Hämoglobins 1o9
9.1.2 Hämabspaltung 1o9

9.2 Kettentrennung 11o

9.2.1 Gegenstromverteilung 11o
9.2.2 Chromatographie über CM-Cellulose 11o

9.3 Proteinmodifizierungen 111

9.3.1 Oxidation mit PAS 111
9.3.2 Carboximethylierung 111

Seite

9.3.3 Sulfonierung 111

9.3.4 Blockierung mit MSA 1o9

9.4 Enzymatische und chemische Spaltungen 112

9.4.1 Tryptische Spaltung 112

9.4.2 Limitiert-tryptische Spaltung 112

9.4.3 Spaltung mit Protease Aureus V8 112

9.4.4 Spaltung mit Bromcyan 113

9.4.5 Hydrolytische Spaltung der ASP-PRO-Sequenz 113

9.4.6 Spaltung mit BNPS-Skatol 113

9.5 Gelchromatographie 114

9.5.1 Entsalzungen 114

9.5.2 Peptidtrennungen 114

9.6 Ionenaustauschchromatographie 114

9.6.1 Dowex 5o 114

9.6.2 Weitere Austauscher 115

9.7 Elektrophorese 115

9.7.1 HS-Elektrophorese 115

9.7.2 Gelelektrophorese 116

9.8 Auswertung der Trennungen 116

9.9 Aminosäureanalyse 116

9.1o N-terminaler Aminosäureabbau 117

9.1o.1 Manuelle Endgruppenbestimmung 117

9.1o.2 Automatische Sequenzanalyse 117

9.1o.3 Identifizierung der PTH-Aminosäuren 118

LITERATURVERZEICHNIS 119

ABKÜRZUNGEN

A, B..,1,2...	α-helicale Bereiche der α- und β-Ketten und die Position der Aminosäure in der betreffenden Helix
AB,BC..,1,2..	interhelicale Bereiche der α- und β-Ketten und die Position der Aminosäure in dem betreffenden Bereich
AI,AII..	Hämoglobinkomponenten des Huhnes
α3 (A1) SER	Serin ist die dritte Aminosäure vom N-Terminus in den α-Ketten und die erste Aminosäure der A-Helix der α-Ketten
Ap1	erstes Bruchstück vom N-Terminus nach limitiert-tryptischer Spaltung
APpI	erstes Bruchstück vom N-Terminus nach säurehydrolytischer Spaltung der ASP-PRO-Bindung
APpIIGpI	durch Nachspaltung mit Protease Aureus V8 eines ASP-PRO-Peptides erhaltenes Bruchstück
ATP	Adenosintriphosphat
BNPS-Skatol	2-(2-Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromindol
CBpI	erstes Bruchstück vom N-Terminus nach Spaltung mit Bromcyan
CM-	Carboxymethyl-
Core-	hydrophober Bereich der α- und β-Ketten; die Peptide aus diesem Bereich fallen nach Spaltung der Ketten in wässriger Lösung aus und können von den übrigen Peptiden abzentrifugiert werden
DCA	Dichloressigsäure
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DPG	2,3-Diphosphoglycerat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E	Extinktion

ABKÜRZUNGEN (Fortsetzung)

GG	Graugans
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HG	Hausgans
HU	Huhn
HOS	Homoserin
HS-	Hochspannungs-
JAA	Jodacetamid
IP	isoelektrischer Punkt
IPP	myo-Inositol-1,3,4,5,6-pentaphosphat
MCE	Mercaptoethanol
med.	medium
MSA	Maleinsäureanhydrid
NaAc	Natriumacetat
p5o	Sauerstoffpartialdruck, bei dem das Hämoglobin zu 5o% gesättigt ist
PAS	Perameisensäure
PTH-	Phenylthiohydantoin
QUADROL	N,N,N,N-Tetrakis-(2-hydroxypropyl)-ethylendiamin
R I	4-(Isothiocyanato)benzolsulfonsäure(Na-Salz)
R II	5-(Isothiocyanato)benzol-1,3-disulfonsäure (Na-Salz)
R IV	7-(Isothiocyanato)naphtalin-1,3,5-trisulfonsäure (Na-Salz)
SG	Streifengans
ST	Strauß
TPCK-Trypsin	mit N-Tosyl-L-phenylalanyl-chloromethylketon behandeltes Trypsin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

Das Hämoglobin ist eines der best untersuchten Moleküle der Biochemie. Es kann in ausreichender Menge und sehr leicht erhalten werden. Die Kristallisation gelang REICHERT [1] 1849 als erstes Protein. 1953 wurde von TEICHMANN [2]die prosthetische Gruppe,das Häm,(Teichmannkristalle)isoliert. 1912 wurde die Struktur des Häm von KÜSTER [3] vorgeschlagen und 1929 von FISCHER [4] synthetisiert. Es stellte sich heraus, daß das Protoporphyrin IX nicht nur die gleiche prosthetische Gruppe bei den Hämoglobinen der verschiedenen Spezies war, sondern auch in anderen respiratorischen Proteinen wie Myoglobin und Cytochromen [5] vorkam. Die physikalischen, chemischen und physiologischen Unterschiede der einzelnen Proteine mußten folglich im Globinanteil begründet sein. Die erste vollständige Primärstruktur wurde von BRAUNITZER [6] 1961 und die erste Raumstruktur von PERUTZ [7] und KENDREW [8] veröffentlicht. Inzwischen sind viele Hämoglobine untersucht worden.

Die Hämoglobine der Vertebraten liegen in einer tetrameren Form vor, die sich aus Paaren zweier verschiedener Ketten [9/1o] aufbaut. Entwicklungsstufen einer Spezies konnten unterschiedliche Kettentypen zugeordnet werden (embryonal, fötal, usw.) [11-13]. Weiterhin wurden mehrere Komponenten in verschiedener Anzahl in einer Spezies gefunden, deren Bedeutung bis heute noch unklar ist. Seit der Aufklärung der Sichelzellenanämie von PAULING [14] auf molekularer Basis, sind eine Reihe von abnormalen Hämoglobinen [15] beim Menschen entdeckt worden, die sich vom menschlichen Hämoglobin meist nur durch den Austausch einer einzigen Aminosäure unterscheiden. Der Vergleich verschiedener Kettentypen sowie

gleicher Ketten verschiedener Spezies, ergab eine Homolgie [16] der Ketten untereinander. Bei letzteren konnte ein Zusammenhang zwischen Verwandschaftsgrad und Zahl der Aminosäurenaustausche hergestellt werden. Anhand der Austausche konnte ein phylogenetischer Stammbaum [17] aufgestellt werden, der gut mit den morphologischen Daten übereinstimmt.

Die Sauerstofftransportfunktion des Hämoglobins ist nicht isoliert zu sehen. Sie wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflußt wie Temperatur, pH-Wert, CO_2, Anionen (z.B. Cl^-) und organischen Phosphaten. Bei Vögeln wird IPP [18/19], Fischen ATP und GTP [18] und Säugern DPG [18/2o] als heterotropher allosterischer Effektor gefunden.

2. PROBLEM DER HÖHENATMUNG

Seit der Arbeit von HALL et al. [21] ist bekannt, daß das Blut der im Hochland lebenden Tiere eine höhere Sauerstoffaffinität zeigt, als das Blut der Tiere, die auf Meereshöhe leben. Damit verbunden ist eine höhere Resistenz gegenüber hypoxischer Hypoxie. Dafür können folgende Mechanismen verantwortlich sein:

a) Die intrinsische Sauerstoffaffinität des Hämoglobins der Hochlandtiere ist höher als die der Tieflandtiere.

b) Die Phosphatkonzentration in den Erytrozyten der Hochlandtiere ist niedrig.

c) Die Wechselwirkung dieser organischen Phosphate mit dem Hämoglobin ist erniedrigt.

BRAUNITZER et al.[21] haben erst kürzlich den Mechanismus auf molekularer Ebene beim Lama aufgeklärt. Die Erhöhung der Sauerstoffaffinität konnte mit Mechanismus c) erklärt werden. Beim Lama war im Gegensatz zu seinem im Tiefland lebenden Antipoden (Kamel) β2 HIS durch ASN ersetzt. β2 HIS ist eine der 7 Bindungsstellen des DPG. β2 ASN im Lama kann durch die kürzere Seitenkette nicht mit dem DPG in Wechselwirkung treten. Diese Verringerung um zwei Bindungsstellen im Hämoglobinmolekül bewirkt die Erhöhung der Affinität.

Mit dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Hochlandatmung der Vögel auf molekularer Ebene untersucht werden. HALL et al. [23] haben schon 1936 über eine erhöhte Sauerstoffaffinität bei der bolivianischen Gans (Choephaga melanoptera) und dem amerikanischen Strauß (Rhea americanica) berichtet. PETSCHOW et al. [24] beschreiben den gleichen Effekt bei der Streifengans (Anser indicus) im Gegensatz zu Tieflandgänsen Graugans (Anser anser) und Kandagans (Branta canadensis canadensis). Hierbei wurden drei wichtige Aspekte festgestellt:

1. Die Phosphatkonzentration (IPP) war bei Gänsen fast identisch (somit konnte Mechanismus b) ausgeschlossen werden.

2. Die Sauerstoffaffinitäten der phosphatfreien Hämoglobine waren nur geringfügig verschieden.

3. Erst Hämoglobine mit IPP zeigten einen signifikanten Affinitätsunterschied zwischen den Tieflandvögeln (Graugans und Kanadagans) und dem Hochlandvogel (Streifengans).

Diese deutete auf einen dem Lama ähnlichen Mechanismus hin. Die Primärstruktur sollte eine Klärung des Problems ermöglichen. Mit Bearbeitung des afrikanischen Straußes (Struthio camelus),

als Vertreter eines typischen Tieflandtieres, hofften wir zusätzliche Informationen zu erhalten. Weiterhin war der Strauß wegen seiner Stellung als Urvogel und "lebendes Fossil" von Interesse.

Die Vogelsystematik ist umstritten und über die Evolution der Vögel ist wenig bekannt. Hierzu soll diese Arbeit zusätzlich einen Beitrag leisten.

Mit der Analyse des Hämoglobins der Hausgans wurde die Arbeit zum Studium der Methodik begonnen, da hier Blut leicht in ausreichender Menge erhalten werden konnte.

3. CHARAKTERISIERUNG DER HÄMOGLOBINE

Die Erytrozyten der Vögel sind im Gegensatz zu Säugern kernhaltig: Sie sind fast doppelt so groß wie die des Menschen. Nach Hämolyse und Zentrifugation der Kerne und Membranen erhält man die Hämoglobinlösung. Die Konzentration des Blutfarbstoffes wurde durch das Absorptionsmaximum bei 54onm in der Metcyanform bestimmt. Aus 1o ml Blut konnten 1.3 - 1.5 g Hämoglobin gewonnen werden.

3.1 ELEKTROPHORESE

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Anzahl und Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten bei unterschiedlicher Ligandierung identisch war. Die besten Ergebnisse wurden nach 1 - 2-stündiger Elektrophorese erhalten. Die Gele wurden sowohl direkt als auch gefärbt vermessen (Abb. 2) und photographiert (Abb. 1).

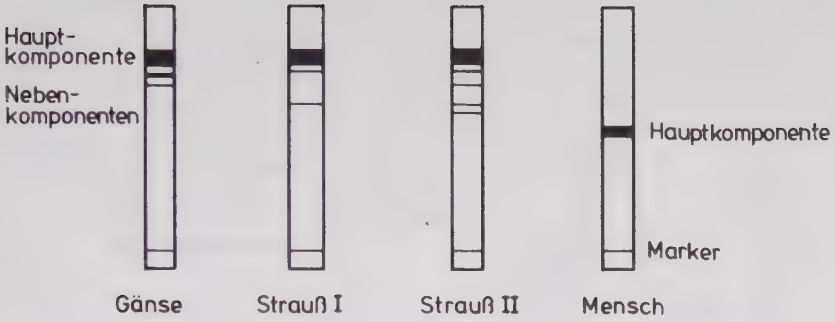


Abbildung 1

Analytische Trennung und Nachweis der verschiedenen Hämoglobinkomponenten der Vögel durch Gelelektrophorese über Polyacrylamidgel in Glasröhrchen im Vergleich zur Hämoglobinhauptkomponente des Menschen. Die obere gefärbte breite Zone entspricht jeweils der Hauptkomponente, während die schneller wandernden schmalen Zonen die Nebenkomponenten darstellen.

Bedingungen: 10%-iges Polyacrylamidgel in Glasröhrchen (Durchmesser 0.5cm, Länge 10cm) mit Tris/HCl-Puffer (pH 8.9); Elektrodenpuffer:Tris/HCl (pH 8.3); Elektrophoresezeit:1 1/2h (bei 3.5mA pro Proberöhrchen); als Marker wurde Bromphenolblau zugegeben; Fixierung der Hämoglobinbanden mit 7%-iger HAc und Anfärbung mit 1%-iger Amidoschwarz-10B-Lösung in 7%-iger HAc.

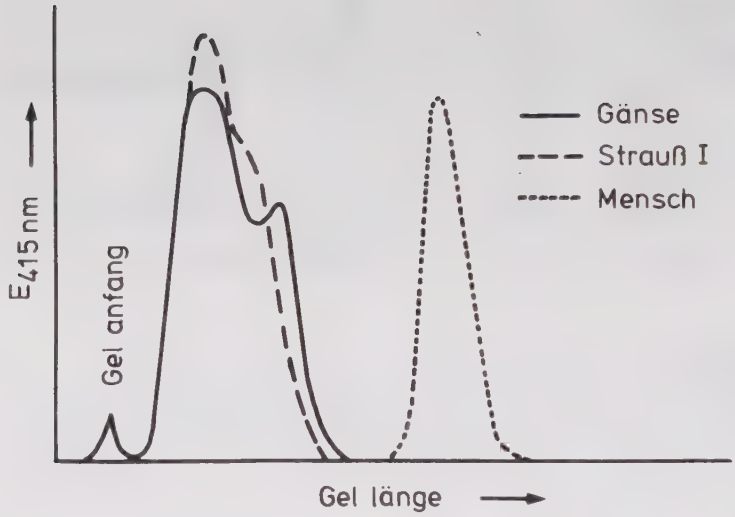


Abbildung 2

Densitometrische Vermessung der Gele (vergleiche Abb.1) bei 415nm in einem Gilford Spektrophotometer 24o nach der Elektrophorese und vor Fixierung und Anfärbung.

Das Maximum der Hämoglobinhauptkomponente von Gänsen und Strauß findet man im Gel an identischer Position, während sich die Nebenkomponenten (als Schulter zu erkennen) in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit unterscheiden.

Das Bandenmuster ist bei den drei Gänsearten identisch: Eine langsame Hauptbande mit zwei schnelleren Nebenbanden. Die Hauptbande des Straußenhämoglobins war elektrophoretisch identisch mit derjenigen der Gänse. Die Nebenbanden waren in Anzahl und Lage verschieden. Bei zwei verschiedenen Blutsendungen waren die Nebenbanden nicht identisch (Abb. 1: Strauß I und Strauß II).

3.2 CHROMATOGRAPHIE

Es sollten einerseits die Befunde der Elektrophorese bestätigt,andererseits eine Methode zur Trennung der Nebenkomponenten und somit Isolierung der Hauptkomponenten entwickelt werden.

Nach Vorversuchen erwies sich die CM-Cellulose als der geeignete Träger. Die Puffer mußten mit o,1 % MCE versetzt werden, um eine Autoxidation und somit eine Aufspaltung in nicht reelle Gipfel zu vermeiden. Die Chromatogramme waren größtenteils identisch (Abb. 3). Es konnten drei bis vier Nebenkomponenten isoliert werden, die nicht weiter untersucht wurden.

4. TRENNUNG DER KETTEN

Zur Isolierung der α- und β-Ketten des tetrameren Hämoglobins mußte das Häm abgespalten werden.

Es wurde sowohl die Abspaltung in Aceton/HCl als auch mit

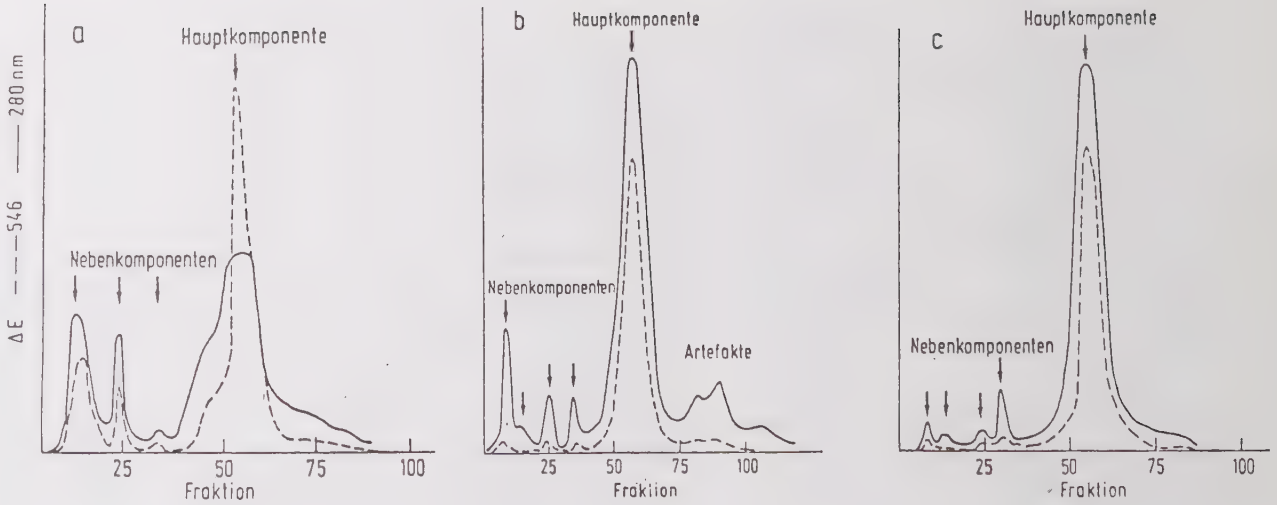


Abbildung 3

Präparative Trennung der Hämoglobinkomponenten mit Ionenaustauschchromatographie. Die Hämoglobinhauptkomponente des einzelnen Vogels konnte gut von den Nebenkomponenten abgetrennt werden. Auch innerhalb der Nebenkomponenten wurde eine gute Auftrennung erreicht. (a = Hausgans, b = Graugans, c = Streifengans).

Bedingungen: CM-Cellulose (CM-52); Säulendimension: 2.5 x 45cm; Ansatz mit 1g HG-, o.5g GG-, o.15g SG-Hämoglobin; linearer Gradient mit je 45oml o.o1m Phosphatpuffer (pH 6.9) und o.2m Phosphatpuffer (pH 6.9); Durchfluß: 4oml/h; Fraktionsvolumen: 6ml.

Ethylmethylketon (bei pH 2 der Hämoglobinlösung) versucht. Letztere ist zwar schneller und weniger aufwendig, aber für Vogelhämoglobine nicht geeignet. Die Abspaltung war auch nach Wiederholung nur unvollständig, so daß nur rot-braun gefärbte Globinpräparate erhalten wurden.
Nach einer von ROSSI-FANELLI [26] entwickelten,aber in dieser Arbeit modifizierten Methode, wurden dagegen nach einmaliger Abspaltung weiße Präparate erhalten.

4.1 TRENNUNG DURCH GEGENSTROMVERTEILUNG

Die klassische Methode Globin in die α- und β-Ketten aufzutrennen ist die Gegenstromverteilung von CRAIG (siehe exp. Teil). Durch Vorversuche wurde hier ein System von 1 % DCA/ n-Butanol-2 gewählt. Nach 15o Verteilungen wurde beim Vermessen der Fraktionen bei 28onm nur ein Gipfel gefunden, während bei der Ninhydrinreaktion eine breite flache Bande zusätzlich zwischen den Fraktionen o-9o zu erkennen war (Abb. 4). Hier wurde die α-Ketten vermutet. Die große scharfe Bande wurde vermutlich durch die β-Ketten verursacht. Die Aminosäureanalyse konnte diesen Intensitätsunterschied erklären. In den α-Ketten wurde wie beim Huhn, kein Tryptophan gefunden, das zum großen Teil für die Absorbtion bei 28onm verantwortlich ist.

4.2 KETTENTRENNUNG MIT CM-CELLULOSE

CLEGG und NAUGHTON [28] hatten eine Trennung der Ketten von Humanglobin über CM-Cellulose mit Phosphatpuffer (pH 6.7 - 6.9) in 8 m Harnstoff beschrieben. Bei diesen Bedingungen konnte mit nativem, und derivatisiertem, Globin bei verschiedenen Gradienten keine Auftrennung erreicht werden.

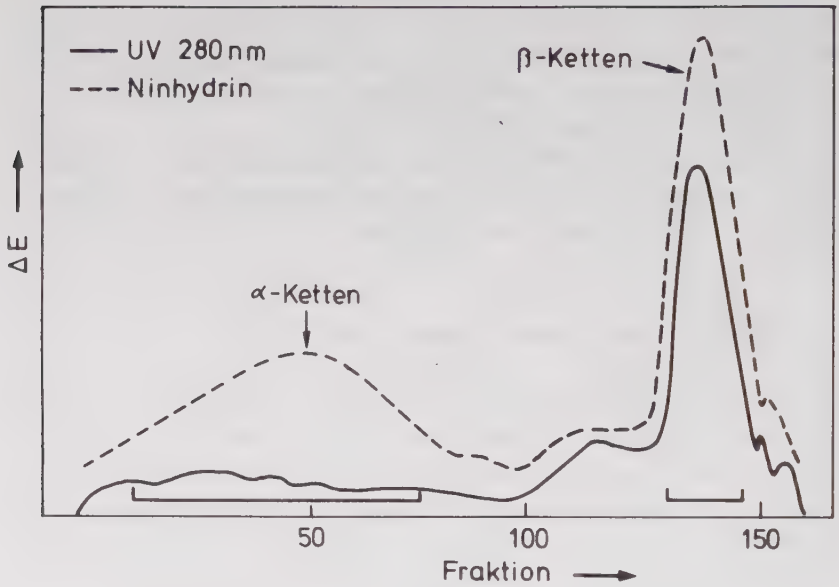
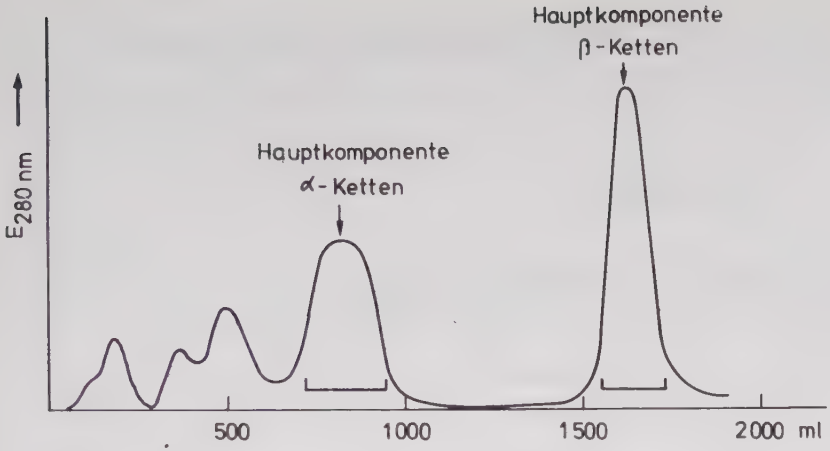


Abbildung 4
Isolierung der α- und β-Ketten von Hausgansglobin durch Gegenstromverteilung.
Bedingungen: Ansatz mit 1oomg CM-Globin; Lösungsmittelsystem: 1%-ige DCA/n-Butanol-2; 15o Verteilungsschritte.

Erst bei Verwendung von NaAc-Puffer (pH 5 - 6) konnte das native Globin (unter Zugabe von o,2 % MCE zur Reduktion der Cysteine) getrennt werden (Abb. 5).

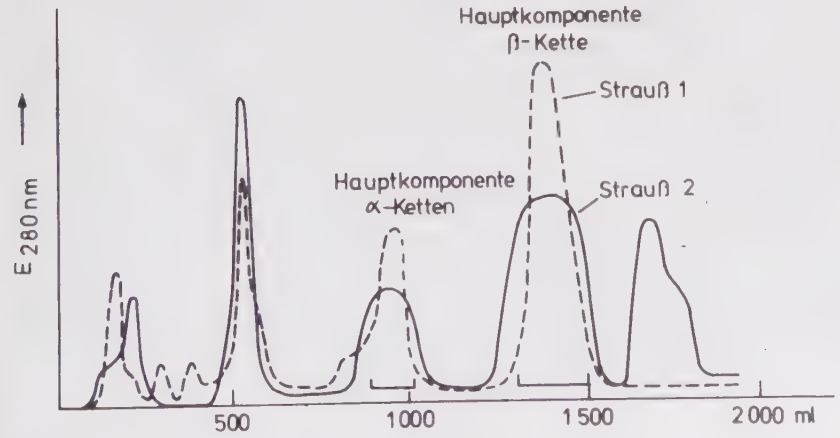
Bei der Trennung des Straußglobins wurden bei zwei verschiedenen Blutsendungen unterschiedliche Elutionsprofile erhalten (Abb. 6). Die Gipfel der α- und β-Ketten der Hauptkomponente waren in identischer Position und in den Bruttoformeln wurden keine Unterschiede gefunden.



Abbildungen 5(oben) und 6(unten)

Kettentrennung über CM-Cellulose von Gänse- (oben) und Straußglobin (unten). Ohne vorherige Abtrennung der Nebenkomponenten lassen sich die α- und β-Ketten der Hauptkomponente isolieren.

Bedingungen: Ansatz mit 2.og Globin; CM-Cellulose(CM-52); Säulendimension:5.o x 15 cm; Startpuffer: o.o2m NaAc (pH 5.o), 8m Harnstoff, o.2% MCE; 1.Gradient: Startpuffer + o.7m NaCl; 2.Gradient: Startpuffer (pH 5.8) + 1.2m NaCl; 3.Gradient: Startpuffer (pH 5.8) + 3.om NaCl; Durchfluß:1ooml/h; Fraktionsvolumen:1oml.



5. ANALYTISCHE REINHEITSPRÜFUNG DER α- UND β-KETTEN

5.1 ELEKTROPHORESE

Im Gegensatz zu den Hämoglobinen lösen sich die Ketten und Globine der Vögel nur in stark denaturierenden Lösungsmitteln. Es wurde in Anlehnung an eine Arbeit von KENNETH (siehe exp. Teil) ein System von 8 m Harnstoff (pH 3.5) mit Formiatpuffer gewählt und die α- und β-Ketten und Globine über ein 5 %-iges Polyacrylamidgel in Röhrchen elektrophoretisiert (siehe exp. Teil).

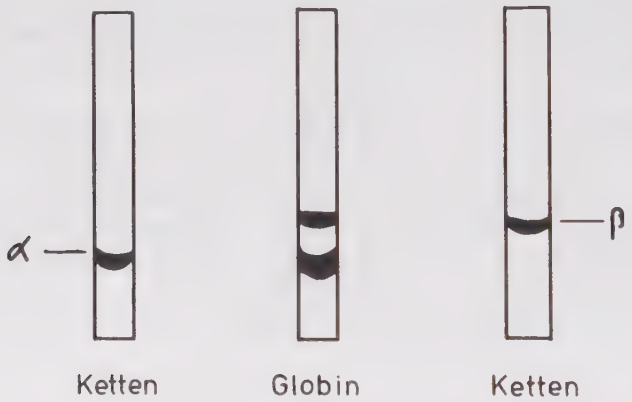


Abbildung 7
Elektrophorese der α- und β-Ketten und des Globins in Harnstoffgel(Gänse).
Bedingungen: 5%-iges Polyacrylamidgel in Glasröhrchen (Durchmesser o.5 cm, Länge 1o cm) mit Na-Formiatpuffer (pH 3.5) in 8m Harnstoff; Elektrophoresezeit 1 1/2h (bei 4.5 mA pro Proberöhrchen und Kühlung auf 4°C); Fixierung der Proteinbanden mit 7%-iger HAc und Anfärbung mit 1%-iger Amidoschwarz-1oB-Lösung(in 7%-iger HAc).

5.2 BRUTTOFORMELN DER KETTEN

Die Analyse der Ketten wurde mehrmals durchgeführt bei unterschiedlicher Hydrolysedauer und mit verschiedener Modifizierung der Seitenketten von Cys und Met. Aus Kombination dieser Daten wurden die Bruttoformeln erstellt (Tab. 1-2). Einige Werte weichen von der theoretischen Zusammensetzung ab. Diese Unterschiede sind nur geringfügig und liegen innerhalb der Fehlergrenzen des Analysators.

Keine der α-Ketten enthält Tryptophan. Die entsprechenden Ketten der verschiedenen Vögel sind in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich.

5.3 N-TERMINALE SEQUENZEN

Die SH-Gruppen der Ketten wurden mit Jodacetamid umgesetzt und die Ketten zwischen 4o und 6o Schritten im Sequenator (Quadrolprogramm) analysiert. Die über CM-Cellulose isolierten α- und β-Ketten erwiesen sich als sehr sauber.
Die über CM-Cellulose isolierten Ketten erwiesen sich als sehr sauber.

5.3.1 Übersicht des Abbaus der Ketten

Es wird angegeben, wieviel Reste vom N-Terminus der jeweiligen Kette des Vogelhämoglobins im Sequenator abgebaut wurden.

α-Ketten	Schritte	β-Ketten	Schritte
Hausgans	1 - 4o	Hausgans	1 - 5o
Graugans	1 - 6o	Graugans	1 - 45
Streifengans	1 - 4o	Streifengans	1 - 45
Strauß	1 - 4o	Strauß	1 - 45

Tabelle 1

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 4 isolierten α-Ketten im Aminosäureanalysator bestimmt (A = Anzahl der Aminosäuren aus der Sequenz, B = Unterschied im Vergleich zur Graugans, a = rechnerisch korrigierte Werte, b = durch 2ooh Hydrolyse korrigiert, c = vergl. Abkürzungen). Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	HG[c]	A	GG[c]	A	SG[c]	A	B	ST[c]	A	B
ASX	11.92	1o	1o.44	1o	1o.54	1o		12.28	11	- 1
THR[a]	7.o4	8	7.1o	8	7.9o	8		8.42	8	
SER[a]	6.66	7	6.54	7	8.62	8	+ 1	1o.o6	1o	+ 3
GLX	11.45	1o	9.74	1o	1o.19	1o		1o.77	1o	
PRO	4.58	5	4.46	5	4.33	4	- 1	4.69	5	
GLY	8.86	9	8.61	9	7.9o	8	- 1	7.31	8	- 1
ALA	19.29	19	19.16	19	19.53	19		15.81	16	- 3
VAL[b]	13.53	14	14.o8	14	14.56	15	+ 1	11.17	11	- 3
ILE[b]	4.56	5	4.78	5	4.7o	5		8.24	8	+ 3
LEU	15.11	14	14.57	14	14.oo	14		15.15	15	+ 1
TYR	3.58	4	3.63	4	3.53	4		4.2o	4	
PHE	7.73	8	8.o2	8	8.23	8		7.1o	7	- 1
LYS	11.98	12	13.o9	12	12.25	12		12.49	12	
HIS	9.o6	1o	1o.63	1o	9.98	1o		1o.41	1o	
ARG	3.17	3	3.69	3	3.28	3		3.37	3	
MET	o.97	1	o.91	1	o.93	1		1.o9	1	
CYS	1.86	2	1.81	2	1.35	2		1.67	2	
TRP	o.o1	-	o.oo	-	o.oo	-		o.o3	-	
Summe		141		141		141			141	

Tabelle 2

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 4 isolierten β-Ketten im Aminosäureanalysator bestimmt (A = Anzahl der Aminosäuren aus der Sequenz, B = Unterschied im Vergleich zur Graugans, a = rechnerisch korrigierte Werte, b = durch 2ooh Hydrolyse korrigiert, c = vergleiche Abkürzungen). Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	HG[c]	A	GG[c]	A	SG[c]	A	B	ST[c]	A	B
ASX	14.39	13	13.64	13	14.27	14	+ 1	13.22	13	
THR[a]	5.33	6	6.69	6	7.57	6		5.77	6	
SER[a]	6.43	7	6.81	7	8.o8	7		7.91	7	
GLX	12.49	12	12.oo	12	11.34	11	- 1	12.5o	13	+ 1
PRO	4.82	5	4.42	5	5.16	5		4.51	5	
GLY	7.97	8	8.o6	8	8.oo	8		7.41	8	
ALA	17.95	17	17.92	17	18.1o	17		16.63	17	
VAL[b]	12.o2	12	1o.41	12	12.32	12		11.63	12	
ILE[b]	6.48	7	6.74	7	6.32	7		6.9o	7	
LEU	18.77	18	18.29	18	17.57	18		17.79	18	
TYR	2.16	2	2.14	2	2.14	2		1.76	2	
PHE	7.8o	8	8.62	8	8.15	8		8.13	8	
LYS	11.16	1o	1o.81	1o	1o.49	1o		11.45	1o	
HIS	6.64	7	7.49	7	7.44	7		6.84	6	- 1
ARG	6.68	6	6.46	6	5.96	6		5.53	6	
MET	o.57	1	1.13	1	1.o4	1		o.93	1	
CYS	2.47	4	2.24	4	2.66	4		2.54	4	
TRP	2.44	3	3.18	3	3.18	3		3.o5	3	
Summe		146		146		146			146	

5.3.2 Sequenzanalyse

Es wird die Aminosäurenfolge, die beim automatischen Abbau der intakten α- und β-Ketten der Vogelhämoglobine erhalten wurde, wiedergegeben.

Hausgans, α-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-LEU-SER-ALA-ALA-ASP-LYS-THR-ASN-VAL-LYS-GLY-VAL-PHE-SER-LYS-ILE-

        20                  25                  30
GLY-GLY-HIS-ALA-GLU-GLU-TYR-GLY-ALA-GLU-THR-LEU-GLU-ARG-MET-PHE-THR-

35                  40
ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS
```

Graugans, α-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-LEU-SER-ALA-ALA-ASP-LYS-THR-ASN-VAL-LYS-GLY-VAL-PHE-SER-LYS-ILE-

        20                  25                  30
GLY-GLY-HIS-ALA-GLU-GLU-TYR-GLY-ALA-GLU-THR-LEU-GLU-ARG-MET-PHE-THR-

35                  40                  45                  50
ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS-THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-GLN-HIS-GLY-

            55                  60
SER-ALA-GLN-ILE-LYS-ALA-HIS-GLY-LYS
```

Streifengans, α-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-LEU-SER-ALA-ALA-ASP-LYS-THR-ASN-VAL-LYS-GLY-VAL-PHE-SER-LYS-ILE-

        20                  25                  30
GLY-SER-HIS-ALA-GLU-GLU-TYR-GLY-ALA-GLU-THR-LEU-GLU-ARG-MET-PHE-THR-

35                  40
ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS
```

Strauß, α-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-LEU-SER-GLY-THR-ASP-LYS-THR-ASN-VAL-LYS-GLY-ILE-PHE-SER-LYS-ILE-

        20                  25                  30
SER-SER-HIS-ALA-GLU-GLU-TYR-GLY-ALA-GLU-THR-LEU-GLU-ARG-MET-PHE-ILE-

35                  40
THR-TYR-PRO-GLN-THR-LYS
```

Hausgans, β-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-HIS-TRP-SER-ALA-GLU-GLU-LYS-GLU-LEU-ILE-THR-GLY-LEU-TRP-GLY-LYS-

        20                  25                  30
VAL-ASN-VAL-ALA-ASP-CYS-GLY-ALA-GLU-ALA-LEU-ALA-ARG-LEU-LEU-ILE-VAL-

35                  40                  45                  50
TYR-PRO-TRP-THR-GLN-ARG-PHE-PHE-SER-SER-PHE-GLY-ASN-LEU-SER-SER
```

Graugans und Streifengans, β-Ketten

identisch mit Hausgans

Strauß, β-Ketten

```
1               5                   10                  15
VAL-GLN-TRP-SER-ALA-GLU-GLU-LYS-GLU-LEU-ILE-SER-GLY-LEU-TRP-GLY-LYS-

        20                  25                  30
VAL-ASN-VAL-ALA-ASP-CYS-GLY-ALA-GLU-ALA-LEU-ALA-ARG-LEU-LEU-ILE-VAL-

35                  40
TYR-PRO-TRP-THR-GLN-ARG
```

6. SPALTUNG DER KETTEN, ISOLIERUNG UND DIE SEQUENZ DER PEPTIDE

6.1 HAUSGANS, α-KETTEN

6.1.1 Bromcyanpeptide

Die Analyse der α-Ketten ergab ein Methionin, das auf Grund N-terminaler Sequenzierung Position 32 einnimmt. Eine spezifische und quantitative Spaltung der Ketten bei Methionin kann mit Bromcyan durchgeführt werden. Nach Spaltung und Entfernung des überschüssigen Bromcyans wurde das Peptidgemisch weiterhin mit Perameisensäure behandelt, um die Cysteine zu oxidieren. Chromatographisch gelang die Isolierung der beiden Peptide über Sephadex.

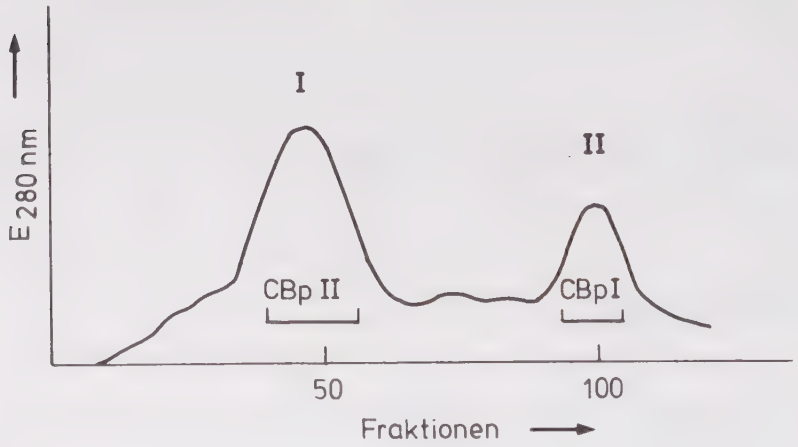


Abbildung 8

Gelchromatographische Trennung der Bromcyanpeptide (HGα). Bedingungen: Ansatz mit 2oomg α-Ketten; Sephadex G-75 med; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase: 1n HAc in 8m Harnstoff; Durchfluß: 2oml/h; Fraktionsvolumen: 5ml.

In Gipfel-I-Fraktion wurde das C-terminale CBpII-Ppetid und in Gipfel-II-Fraktion das N-terminale CBpI-Ppetid gefunden.

6.1.1.1 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.1.1 isolierten Bromcyanpeptide im Aminosäureanalysator bestimmt.
Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	CBpI	Sequenz	CBpII	Sequenz	Kette
ASX	2.2	2	8.3	8	1o
THR	1.6	2	5.4	6	8
SER	1.7	2	4.8	5	7
GLX	4.7(+HOS)4		6.1	6	1o
PRO	-	-	5.o	5	5
GLY	4.o	4	5.1	5	9
ALA	4.3	4	15.3	15	19
VAL	2.6	3	9.5	11	14
ILE	o.8	1	3.2	4	5
LEU	2.o	2	12.4	12	14
TYR	o.7	1	2.5	3	4
PHE	o.9	1	6.9	7	8
LYS	3.o	3	9.1	9	12
HIS	o.9	1	8.9	9	1o
ARG	o.9	1	1.8	2	3
MET	-	1	-	-	1
CYS	-	-	1.5	2	2
Summe		32		1o9	141

6.1.1.2 Sequenz von CBpII

Das in Abschnitt 6.1.1 isolierte Bromcyanpeptid wurde 6o Schritte im Quadrolprogramm abgebaut. Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1               5                   10                  15
PHE-THR-ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS-THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-GLN-
33                          40
        20                  25                  30
HIS-GLY-SER-ALA-GLN-ILE-LYS-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-ALA-ALA-ALA-LEU-
50                                      60
35                  40                  45
VAL-GLU-ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-ILE-ALA-GLY-ALA-LEU-SER-LYS-LEU-
            70                                          80
            55                  60
SER-ASP-LEU-HIS-ALA-GLN-LYS-LEU-ARG
                        90      92
```

6.1.1.3 Sequenz von CBpI

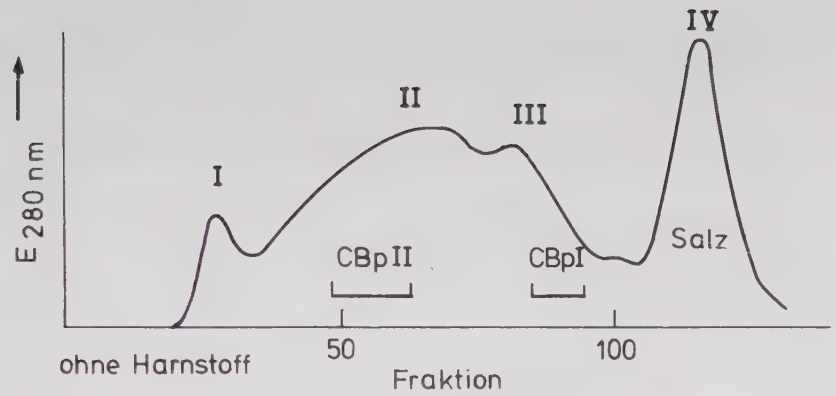
Das Peptid wurde 28 Schritte im Sequenator (Propinprogramm I) abgebaut. Die Aminosäurefolge der N-terminalen Kettensequenzierung konnte bestätigt werden.

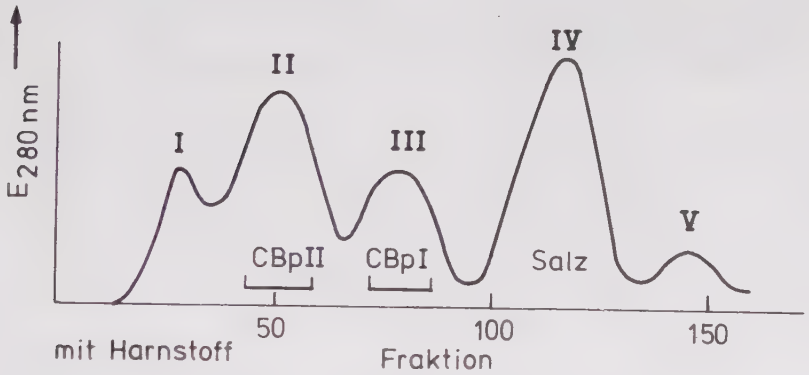
6.2 HAUSGANS, β-Ketten

6.2.1 Bromcyanpeptide

Ebenso wie die α-Ketten enthalten die β-Ketten nur ein Methionin. Dies wurde wie beim Huhn in Position 59 vermutet. Die nach einer Bromcyanspaltung zu erwartenden beiden Peptide (59 und 87 Reste) sollten sich durch Gelfiltration trennen lassen . Um Disulfidbrücken zu vermeiden, wurde das Peptidgemisch mit Perameisensäure oxidiert.

Ohne Harnstoff (Abb. 9a) wurde eine schlechte Auftrennung erhalten. Mit Harnstoff (Abb. 9b) konnten die Peptide rein isoliert werden.





Abbildungen 9a (oben) und 9b (unten)
Die Gelchromatographische Trennung der Bromcyanpeptide (HG β). Bei sonst identischen Bedingungen wurde in Abb. 9a ohne Harnstoff, in Abb. 9b mit Harnstoff gearbeitet. Es ist deutlich zu erkennen, daß ohne Harnstoff nur eine ungenügende Trennung (Aggregation) erreicht wurde, während in Abb. 9b die Peptide in den Gipfel-II- und III-Fraktionen gut isoliert werden konnten.
Bedingungen: Ansatz mit 2oomg β-Ketten; Sephadex G-75; Säulendimension; 13o x 2.5cm; mobile Phase: 1n HAc (in Abb.9b in 8m Harnstoff); Durchfluß: 25ml/h; Fraktionsvolumen: 6ml.

6.2.1.1 Sequenz von HGβ CBpII

Das Peptid wurde 4o Schritte automatisch abgebaut (Quadrol-programm). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
VAL-ARG-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-LEU-THR-SER-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-LYS-
60                                  70
      20                 25                  30
ASN-LEU-ASP-ASN-ILE-LYS-ASN-THR-PHE-ALA-GLN-LEU-SER-GLU-LEU-HIS-CYS-
          80                                                  90
35              40
ASP-LYS-LEU-HIS-VAL-ASP
                99
```

6.2.1.2 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.2.1 isolierten Bromcyanpeptide im Aminosäureanalysator bestimmt.
Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	CBpII	Sequenz	CBpI	Sequenz	Kette
ASX	9,1	9	4,2	4	13
THR	2,8	3	3,o	3	6
SER	1,9	2	4,8	5	7
GLX	7,3	7	5,6 (+HOS)	5	12
PRO	2,o	2	2,6	3	5
GLY	3,o	3	5,1	5	8
ALA	11,5	11	6,3	6	17
VAL	7,1	8	4,o	4	12
ILE	1,5	4	3,1	3	7
LEU	11,2	11	7,2	7	18
TYR	o,7	1	o,8	1	2
PHE	5,o	5	3,1	3	8
LYS	8,o	8	2,o	2	1o
HIS	5,9	6	o,9	1	7
ARG	4,1	4	1,9	2	6
MET	-	-	-	1	1
CYS	1,4	2	o,6	1	3
TRP	-	1	-	3	4
Summe		87		59	146

6.2.2 Arginylpeptide

Die SH-Gruppen der Cysteine wurden mit JAA umgesetzt und die Seitenketten der Lysine mit MSA blockiert. Nach Spaltung mit Trypsin wurde das Peptidgemisch über Sephadex mit harnstoffhaltigem Puffer getrennt (Abb. 1o), um die Aggregation zu verhindern.

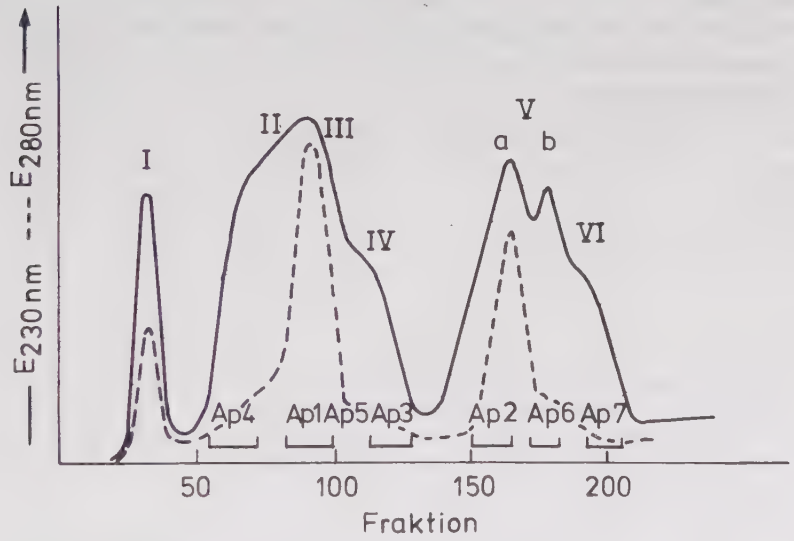


Abbildung 1o

Gelchromatographische Trennung der Arginylpeptide HG nach limitiert-tryptischer Spaltung. Aus den Gipfel-II- und III-Fraktionen konnten saubere Peptide isoliert werden. Bedingungen: Ansatz mit 2oomg β-Ketten; Sephadex G-5o med.; Säulendimension:1oo x 2.5cm; mobile Phase: o.1n Tris/HCl (pH 8.5) in 8m deionisiertem Harnstoff; Durchfluß:2oml/h; Fraktionsvolumen: 3-4ml.

Aus Gipfel II- und IV-Fraktion konnten saubere Peptide isoliert werden (Ap4 und Ap3). Gipfel III-Fraktion enthielt zwei Peptide und die Peptide der Gipfel Va-,Vb-, VI-Fraktion waren verunreinigt. Rechromatographie über DEAE-Sephadex und Dowex 5o ergab keine Trennung (Aggregation).

6.2.2.1 Bruttoformel von Ap3

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.2.2 isolierten Peptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis :

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	2.o8	2	VAL	o.95	1
THR	o.83	1	ILE	o.98	1
SER	3.32	4	LEU	2.14	2
PRO	1.97	2	PHE	2.78	3
GLY	2.o5	2	ARG	o.97	1
ALA	1.2o	1	MET	o.91	1
			Summe		21

6.2.2.2 Sequenz von Ap3

Das Peptid konnte vollständig im Sequenator analysiert werden (Propinprogramm II). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                   5                  10                  15
PHE-PHE-SER-SER-PHE-GLY-ASN-LEU-SER-SER-PRO-THR-ALA-ILE-LEU-GLY-ASN-
41                                     50
        20
PRO-MET-VAL-ARG
            61
```

6.3 ZUSAMMENFASSUNG,HAUSGANS

Die Hausgans sollte zur Einarbeitung in die Methoden als Testobjekt benutzt werden.
Bei weiteren Experimenten, über die hier nicht berichtet wurde, konnten trotz mehrfacher Trennung über Austauscher und Gelfiltration keine sauberen Peptide isoliert werden. Dies sind: Die BNPS-Skatolspaltung (C-terminal vom Tryptophan) und Nachspaltung der Bromcyanpeptide (tryptisch, limitiert-tryptisch). Erfolgsversprechend war die limitiert-tryptische Spaltung, wenn von den α- und β-Ketten direkt ausgegangen wurde. Es mußte nach einer Methode gesucht werden, den C-terminalen Bereich der α- und β-Ketten besser zu analysieren.

6.3.1 Sequenzierschema des Hämoglobins der Hausgans

Es wird angegeben, wieviel Reste vom N-Terminus der jeweiligen Ketten (aus Abschnitt 5.3.2) oder Peptide der α- und β-Ketten (aus Abschnitt 6.1 und 6.2) im Sequenator abgebaut und in welcher Zusammenstellung der Ergebnisse die Primärstrukturen der α- und β-Ketten erhalten wurden. Die Aminosäurefolge der α-Ketten ist bis Position 92, die der β-Ketten bis Position 99 durch überlappende Ketten- und Peptidsequenzanalyse fortlaufend belegt (Darstellung der α- und β-Kettenprimärstruktur Abschnitt 7.1, Tabellen 39 und 4o).

α-Ketten	β-Ketten
1 - 4o Ketten	1 - 5o Ketten
1 - 28 CBpI	41 - 61 Ap3
33 - 92 CBpII	6o - 99 CBpII

6.4 GRAUGANS, α-KETTEN

6.4.1 Bromcyanpeptide

Nach Einwirkung von Bromcyan wurde das Peptidgemisch mit PAS oxidiert und über Sephadex chromatographiert.
Der Gipfel-II-Fraktion konnte Peptid CBpII und der Gipfel-III-Fraktion Peptid CBpI zugeordnet werden.

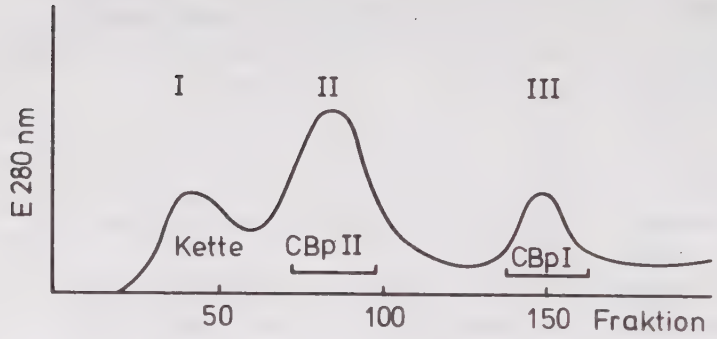


Abbildung 11
Gelchromatographische Trennung der Bromcyanpeptid.. (GGα)
Bedingungen: Ansatz mit 18omg α-Ketten; Sephadex G-75 med.; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase: 1n HAc in 8m Harhstoff; Durchfluß: 2oml/h; Fraktionsvolumen: 4ml.

6.4.1.1 Sequenzanalyse von GGα CBpII

Von diesem Peptid konnten 6o Reste im Quadrolprogramm automatisch abgebaut und identifiziert werden. Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
PHE-THR-ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS-THR-THR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-GLN-HIS-
33                                40                                  50

    20                  25                  30                  35
GLY-SER-ALA-GLN-ILE-LYS-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-ALA-ALA-ALA-LEU-VAL-GLU-
                                    60

            40                  45                  50
ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-ILE-ALA-GLY-ALA-LEU-SER-LYS-LEU-SER-ASP-LEU-
                                                    80

50                  60
HIS-ALA-GLN-LYS-LEU-ARG-
            90      92
```

6.4.1.2 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.4.1 isolierten Bromcyanpeptide im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgende Ergebnisse:

	CBpII	Sequenz	CBpI	Sequenz	Kette
ASX	8.1	8	2.1	2	1o
THR	5.6	6	1.8	2	8
SER	4.9	5	1.9	2	7
GLX	6.9	6	4.9 (+HOS)	4	1o
PRO	4.8	5	-	-	5
GLY	5.3	5	4.1	4	9
ALA	14.8	15	4.o	4	19
VAL	9.7	11	2.9	3	14
ILE	3.4	4	1.o	1	5
LEU	11.9	12	2.o	2	14
TYR	2.8	3	o.9	1	4
PHE	7.1	7	1.o	1	8
LYS	9.o	9	3.o	3	12
HIS	9.1	9	o.9	1	1o
ARG	2.1	2	1.o	1	3
MET	-	-	-	1	1
CYS	1.4	2	-	-	2
Summe		1o9		32	141

6.4.2 Tryptische Peptide

Die mit PAS oxidierten Ketten wurden mit Trypsin gespalten. Die Lösung wurde langsam angesäuert, bis bei pH 6.8 das "Core" ausfiel. Nach Zentrifugieren und dreimaligem Waschen des Rückstandes mit Wasser, wurde dieser in ca. 3-4ml o.1n HAc gelöst. Die Waschlösungen wurden mit dem Überstand vereinigt. Beide Anteile wurden getrennt über Sephadex geschickt.

6.4.2.1 Löslicher Anteil, Gelchromatographie

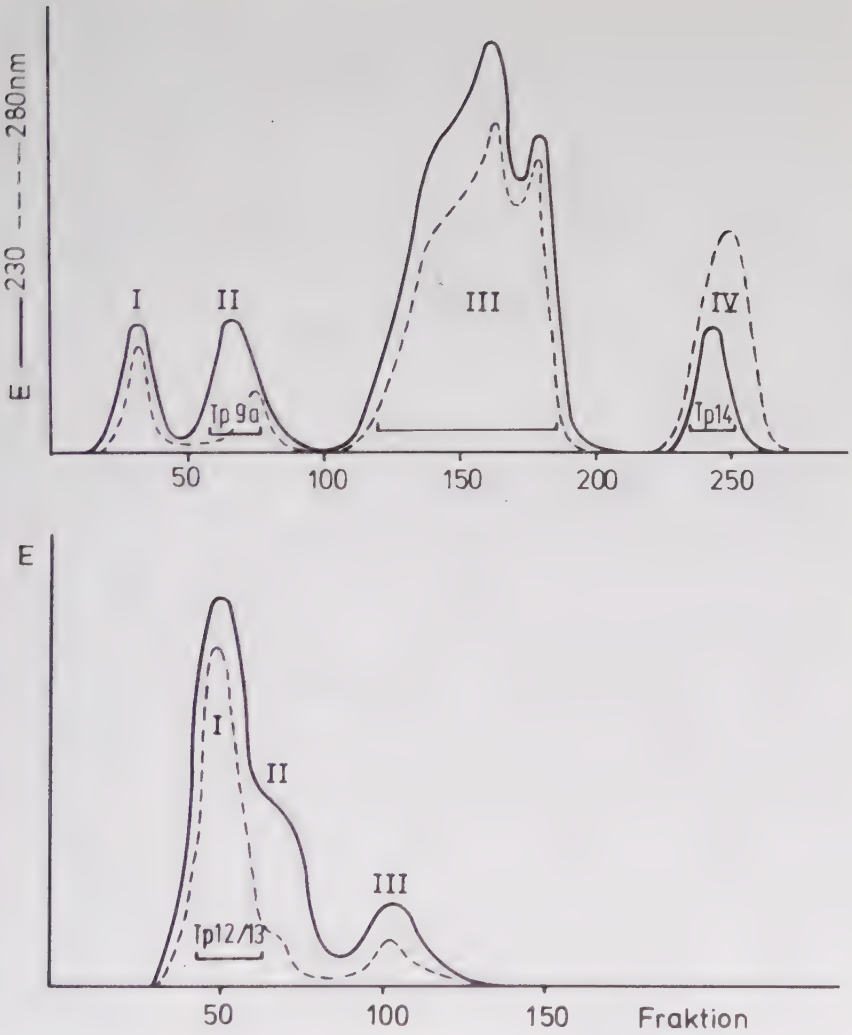
In zwei der vier Gipfelfraktionen waren saubere Peptide enthalten (Abb. 12). Sie konnten ohne weitere Reinigung sequenziert werden. In Gipfel-III-Fraktion konnten die restlichen tryptischen Peptide (außer den "Core"-Peptiden) gefunden werden. Diese Fraktionen wurden einrotiert und über Dowex 5o rechromatographiert.

6.4.2.2 "Core"-Anteil, Gelchromatographie

In Gipfel-I-Fraktion wurde das ungespaltene ditryptische "Core"-Peptid Tp 12/13 (4o Reste) nachgewiesen (Abb. 13). Es war jedoch mit anderen Peptiden verunreinigt. Auch aus den anderen Gipfelfraktionen konnten keine analysehreine Peptide gewonnen werden.

6.4.2.3 Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide von Gipfel-III-Fraktion der Gelchromatographie

Es wurden sieben Gipfelfraktionen erhalten. Die Peptidzusammensetzung der Gipfelfraktionen wurde mit HS-Elektrophorese und verschiedenen Farbtesten analysiert (Abb. 14). Gipfel-I- und Gipfel-V-Fraktion erwiesen sich als Artefakte. In den übrigen Gipfelfraktionen (außer VII) waren zwischen zwei und drei Peptiden enthalten. Aus Gipfel-II-Fraktion ließen sich präparativ mit HS-Elektrophorese Tp1 und Tp11 von Tp5 abtrennen.



Abbildungen 12 (Oben) und 13 (unten)

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (GGα) (löslicher Anteil oben, "Core"-Anteil unten).

Bedingungen: Ansatz mit 2oomg α-Ketten; Sephadex G-25 fine; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase o.1n HAc; Durchfluß: 15 ml/h; Fraktionsvolumen:3-4ml.

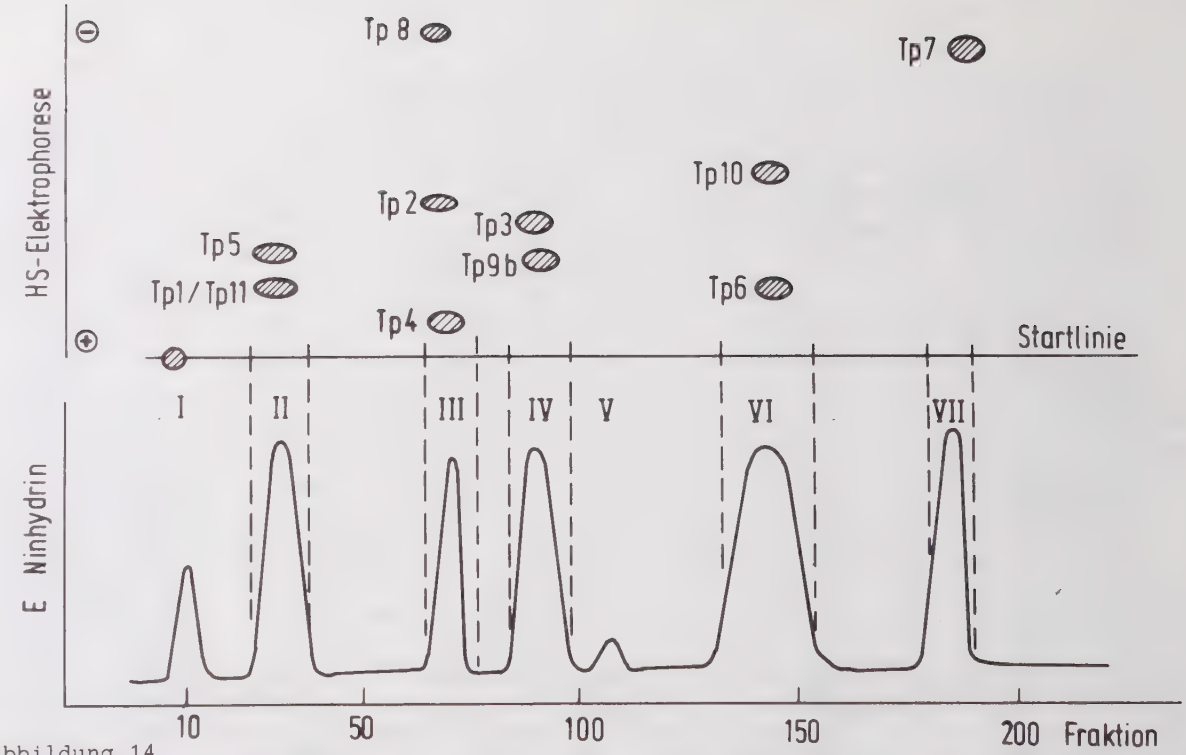


Abbildung 14

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide (GGα) von Gipfel-II-Fraktion der Gelchromatographie (Abb. 12). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten, verschiedenen Farbtesten (siehe exp. Teil) und homologem Vergleich (mit den α-Ketten des Huhns), konnten die Peptide einem bestimmten Kettenabschnitt zugeordnet werden (Tp1, Tp2...usw., siehe Abkürzungen) Bedingungen Austauschchromatographie: Dowex 5o X2; Säulendimension o.6 x 6ocm; Startpuffer: o.o2m Pyridinacetat (pH 3.o); 1. Gradient: o.6m Pyridinacetat (pH 3.35); 2.Gradient: 2.om Pyridinacetat (pH 6.o); Durchfluß 15ml/h; Fraktionsvolumen: 4ml.
Bedingungen HS-Elektrophorese: Whatmann-Papier Nr.1; Elektrophoresepuffer: o.o5m Pyridinacetat (pH 5.4); Elektrophoresezeit: 2h bei 3ooo KV und 5o- 9omA.

Tabelle 3

Bruttoformeln der gesamten tryptischen Peptide von GGα (2o h Hydrolyse in 6n HCl, 2oh bei 11o°C). Die Aminosäureanalyse liefert folgende Ergebnisse:

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp1o	Tp11	Tp12-13	Tp14	Summe Sequ.
ASX	1.o4	1.oo	-	-	-	1.o3	-	-	2.71	1.13	-	1.72	1.39(1)	-	9.92(1o)
THR	-	o.86	-	1.o5	2.oo	o.88	-	-	-	-	-	-	2.45(3)	-	7.24(8)
SER	1.17	-	o.82	-	-	o.91	-	-	1.17	o.87	-	-	1.28(2)	-	6.22(7)
GLX	-	-	1.oo	3.43(3)	1.1o	2.11	-	-	1.25	-	-	-	o.69(1)	-	9.53(1o)
PRO	-	-	-	-	o.86	o.73	-	-	-	-	-	1.1o	1.98	-	4.61(5)
GLY	-	-	-	2.84	-	1.13	o.99	-	1.22	o.95	-	-	3.38(2)	-	1o.51(9)
ALA	1.91	-	-	2.o8	o.99	o.92	1.o4	-	4.23(6)	1.16	-	-	5.56(5)	-	17.89(19)
VAL	o.87	1.oo	1.12	-	-	-	-	-	3.43(3)	-	-	1.44(2)	2.85(6)	-	1o.71(14)
ILE	-	-	-	o.93	-	o.85	-	-	1.83	-	-	-	o.55(1)	-	4.16(5)
LEU	1.o3	-	-	1.o2	-	1.o3	-	-	2.23	1.95	1.o7	-	7.83(6)	-	16.16(14)
TYR	-	-	-	o.94	1.1o	o.8o	-	-	-	-	-	-	-	1.oo	3.84(4)
PHE	-	-	1.o2	-	o.93	2.o8	-	-	-	-	-	1.2o	3.49(3)	-	8.72(8)
LYS	o.89	1.17	1.o2	-	1.o1	1.o6	1.oo	1.oo	1.65(1)	1.oo	-	1.18	2.21	-	13.oo(12)
HIS	-	-	-	1.38(2)	-	1.97	o.97	-	1.o6	o.94	-	-	3.54(4)	-	9.86(1o)
ARG	-	-	-	1.39(1)	-	-	-	-	-	-	o.98	-	-	1.o1	3.38(3)
MET	-	-	-	-	o.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o.98(1)
CYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o.89(2)	-	o.89(2)
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	4o	2	141

6.4.2.4 Sequenz der tryptischen Peptide von GGα

Alle Peptide konnten vollständig (außer Tp12/13) und automatisch abgebaut werden. Lysinpeptide wurden nach Umsetzung mit R I im Quadrolprogramm, Arginylpeptide im Propinprogramm II analysiert (Bruttoformeln Tabelle 3). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
                1               5
Tp1      :      VAL-LEU-SER-ALA-ALA-ASP-LYS
                1               5       7

                1               5
Tp11     :      VAL-ASP-PRO-VAL-ASN-PHE-LYS
               93      95              99

                1               5
Tp5      :      MET-PHE-THR-ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS
               32          35                  40

                1               5                       10
Tp6      :      THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-GLN-HIS-GLY-SER-ALA-GLN-
               41              45                      50

               15
               ILE-LYS
                   56

                1
Tp7      :      ALA-HIS-GLY-LYS
               57      60

                1               5                       10
Tp9a     :      VAL-ALA-ALA-ALA-LEU-VAL-GLU-ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-
               62          65                  70                      75

               15                  20
               ILE-ALA-GLY-ALA-LEU-SER-LYS
                                   80      82

                1               5
Tp9b     :      LEU-SER-ASP-LEU-HIS-ALA-GLN-LYS
               83      85                  90

                1
Tp1o     :      LEU-ARG
                   92

                1               5                       10
Tp12/13  :      PHE-LEU-GLY-HIS-CYS-PHE-LEU-VAL-VAL-VAL-ALA-ILE-HIS-HIS-
               100                                             110

               15                  20
               PRO-SER-ALA-LEU-THR-PRO-GLU-VAL-HIS-ALA
                                   120         123

                1
Tp14     :      TYR-ARG
                   140
```

6.4.3 ASP-PRO-Peptide von GGα

Da die Isolierung und Sequenzierung des "Corebereichs" (ab Rest 1oo) immer schwierig ist, wurde nach einer Methode gesucht, diesen Bereich leichter zu analysieren.

Da in α94/95 die leicht hydrolisierbaren Sequenzen ASP-PRO vorliegen und die beiden Bruchstücke sich in ihrer Größe stark unterscheiden (Trennung durch Gelfiltration), wurde diese Spaltung untersucht.

Es wurden oxidierte, carboximethylierte und native Ketten verwendet (Abb. 15). Die carboximethylierten Ketten lösten sich schlecht und bei oxidierten Ketten traten Nebenspaltungen auf. Die besten Ausbeuten wurden vom nativen Material erhalten. Die günstigsten Bedingungen waren:
Inkubationszeit 6oh (noch keine Nebenspaltungen, optimale Ausbeute) und Temperatur von 41°C.
Das gesuchte Peptid APpII wurde in Ausbeuten von 6o-8o% erhalten. Es wurde auf verschiedene Weise sequenziert. Der Abbau im Quadrolprogramm nach Umsetzung mit R I und R IV erwies sich als ungünstig. Mehr Reste konnten im Propinprogramm II (ohne Umsetzung) abgebaut werden. Aber auch hier konnte das Peptid nicht vollständig sequenziert werden.

6.4.3.1 Sequenzanalyse von GGα APpII

Das Peptid wurde 4o Schritte automatisch abgebaut (Propinprogramm II). Die Reihenfolge der 35 identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10
PRO-VAL-ASN-PHE-LYS-PHE-LEU-GLY-HIS-CYS-PHE-LEU-VAL-VAL-VAL-ALA-ILE-HIS-
95                   100                                          110
    20                  25                  30                  35
-HIS-PRO-SER-ALA-LEU-THR-PRO-GLU-VAL-HIS-ALA-SER-LEU-ASP-LYS-PHE-LEU
                        120                                         129
```

6.4.3.2 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.4.3 isolierten ASP-PRO-Ppetide im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	APpII	Sequenz	APpI	Sequenz	Ketten
ASX	2.2	2	8.3	8	1o
THR	2.8	3	5.1	5	8
SER	2.8	2	4.8	5	7
GLX	1.2	1	2.1	2	5
PRO	2.9	3	2.1	2	5
GLY	2.1	2	7.3	7	9
ALA	5.4	5	12.8	14	19
VAL	6.1	7	6.5	7	14
ILE	o.9	1	3.4	4	5
LEU	6.3	6	8.2	8	14
TYR	o.9	1	2.4	3	4
PHE	4.o	4	3.9	4	8
LYS	3.2	3	9.3	9	12
HIS	4.o	4	6.o	6	1o
ARG	o.9	1	1.8	2	3
MET	-	-	o.8	1	1
CYS	1.5	2	-	-	2
Summe		47		94	141

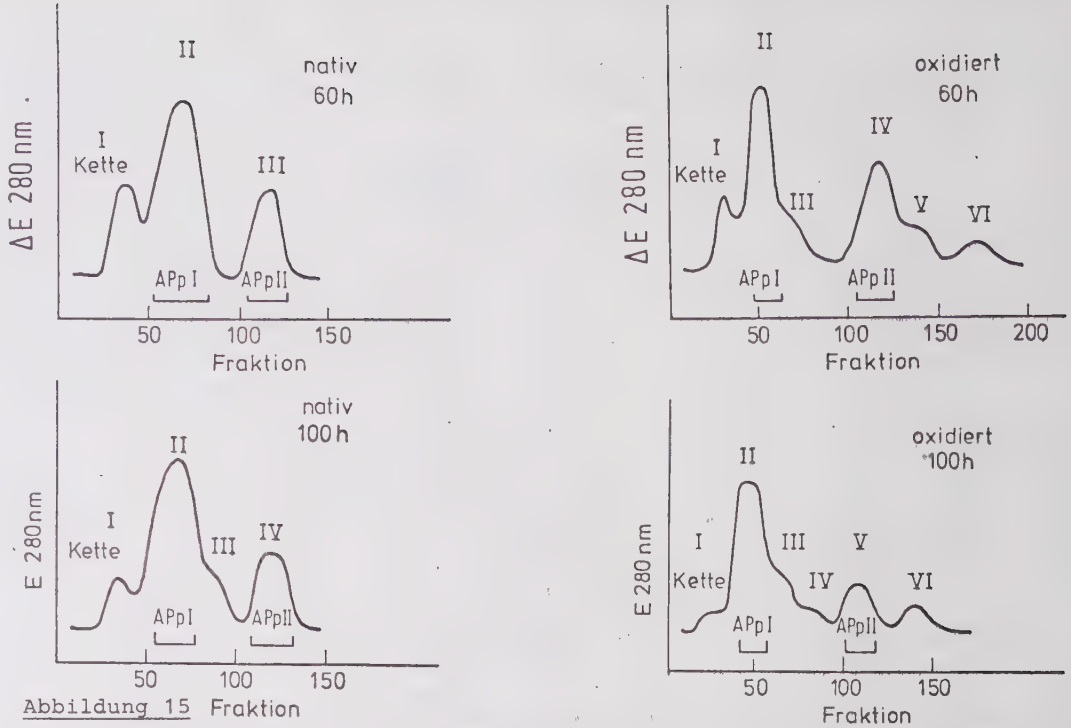


Abbildung 15

Gelchromatographische Trennung der Peptide nach hydrolytischer Spaltung der ASP-PRO-Bindung von GGα. Es ist zu erkennen, daß nach 6oh Spaltung der nativen α-Ketten eine gute Spaltung und Auftrennung erreicht wurde (ohne unspezifische Spaltprodukte). Dagegen wurden bei oxidierten Ketten oder einer Inkubationszeit von 1ooh unspezifische Spaltprodukte erhalten.

Bedingungen: Ansatz mit je 1oomg α-Ketten (oxidiert oder nativ); Sephadex G-25 med.; Säulendimension: 15o x 2.5cm; mobile Phase: 1o%-ige Ameisensäure in 8m Harnstoff; Durchfluß: 2oml/h; Fraktionsvolumen 5-6ml/h.

6.4.4 Nachspaltung von GGα APpII mit Protease Aureus V8

Dieses Enzym spaltet Proteine spezifisch C-terminal von Glutaminsäure (in Ammoniumacetatpuffer pH 4.o oder Ammoniumbicarbonatpuffer pH 7.8). Eine zusätzliche Spaltung bei Asparaginsäure kann in Phosphatpuffer bei pH 7.8 erreicht werden.

Hinter α 12o GLU und α 126 ASP war im APpII-Peptid eine Spaltung mit diesem Enzym möglich. Es war schwierig, das Peptid in den schwachen Puffern zu lösen. Die Spaltung mit suspendiertem Material brachte keinen Erfolg. Durch denaturierende Behandlung mit GuanidinHCl konnte die Löslichkeit erhöht werden. Mehrere Spaltungsansätze (in Ammoniumacetat pH4, Ammoniumbicarbonat pH7.8, Phosphatpuffer pH7.8, Inkubationszeit 5 - 6o h, Temperatur von 37 - 41°C) ergaben entweder keine Spaltung, oder das gesuchte C-terminale Bruchstück konnte nicht isoliert werden.

Versuche mit R I und R II umgesetztem Peptid und Spaltung in harnstoffhaltigen Puffern waren ebenso erfolglos.

Erst nach denaturierender Behandlung mit Phosphorsäure, Spaltung in Phosphatpuffer (pH4.3) konnte eine quantitative Spaltung erzielt und das C-terminale APpIIGpII-Peptid nach Trennung über Dowex 5o isoliert werden (Abb. 16).

Es wurde in der Gipfel-IIIb-Fraktion mit HS-Elektrophorese nachgewiesen und im Sequenator vollständig abgebaut (Propinprogramm II).

6.4.4.1 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.4.4 isolierten Peptide (Nachspaltung mit Protease Aureus V8) im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

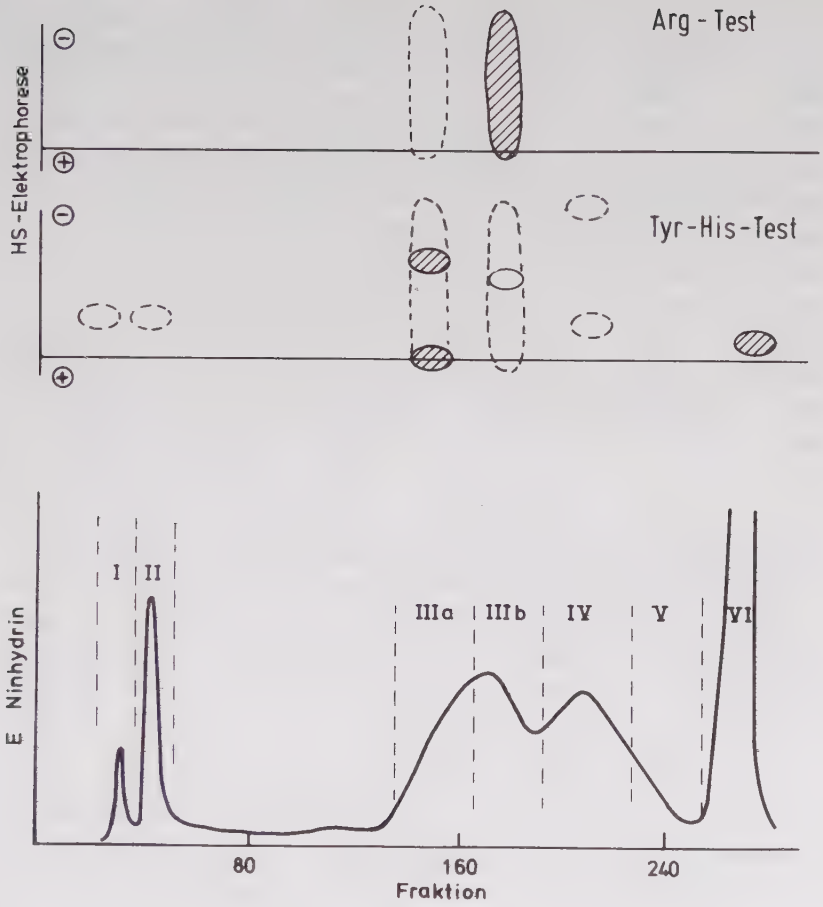


Abbildung 16

Nachspaltung mit Protease Aureus V8 vom Peptid GGα APpII und Trennung der Bruchstücke über Ionenaustauscher. Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese und anschließenden Farbtesten (siehe exp. Teil) auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. In Gipfel-IIIb-Fraktion ist das gesuchte C-terminale APpIIGpII-Peptid und in Gipfel-VI-Fraktion das APpIIGpI-Peptid enthalten.
Bedingungen Austauschchromatographie: Dowex 5o X2; Säulendimension: o.6 x 2ocm; Startpuffer: o.o2m Pyridinacetat (pH 3.o); 1.Gradient: o.6m Pyridinacetat (pH3.35); 2.Gradient: 2.om Pyridinacetat (pH 6.o); Durchfluß: 1oml/h; Fraktionsvolumen 3ml.
Bedingungen HS-Elektrophorese: Whatmann-Papier Nr.1; Elektrophoresepuffer: o.o5m Pyridinacetat (pH 5.4); Elektrophoresezeit: 2 1/2h bei 3oooKV und 5o-9omA.

	APpIIGpI	Sequenz	APpIIGpII	Sequenz	APpII-Sequenz
ASX	1.o4	1	1.o3	1	2
THR	o.96	1	1.9o	2	3
SER	o.91	1	o.87	1	2
GLX	1.o1	1	-	-	1
PRO	2.87	3	-	-	-
GLY	1.15	1	1.27	1	2
ALA	2.o3	2	2.99	3	5
VAL	2.93	4	2.45	3	7
ILE	o.78	1	-	-	1
LEU	3.o9	3	3.32	3	6
TYR	-	-	o.61	1	1
PHE	3.11	3	1.13	1	4
LYS	1.o1	1	1.97	2	3
HIS	2.96	3	o.98	1	4
ARG	-	-	o.95	1	1
CYS	o.92	1	o.89	1	2
Summe		26		21	47

6.4.4.2 Sequenzanalyse von GGα APpIIGpII

Das Peptid (21 Reste) wurde vollständig automatisch abgebaut (Propinprogramm II) und identifiziert. Die Reihenfolge der Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
VAL-HIS-ALA-SER-LEU-ASP-LYS-PHE-LEU-CYS-ALA-VAL-GLY-THR-VAL-LEU-THR-ALA-
121                                 130
    20
-LYS-TYR-ARG
        141
```

6.5 Graugans, β-Ketten

6.5.1 Bromcyanpeptide

Die Spaltung wurde wie bei der Hausgans durchgeführt (Abschnitt 6.2.1), das Chromatogramm war identisch (Abb. 9b). In Gipfel-II-Fraktion der Gelfiltration wurde das CBpII-Peptid gefunden. Es wurde im Sequenator 48 Schritte abgebaut (Quadrolprogramm).

6.5.1.1 Bruttoformel von GGβ CBpII

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.5.1 isolierten Bromcyanpeptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	9.8	9	ILE	1.8	4
THR	2.7	3	LEU	1o.8	11
SER	4.5	5	TYR	o.6	1
GLX	7.1	7	PHE	5.o	5
PRO	1.8	2	LYS	8.2	8
GLY	3.1	3	HIS	6.1	6
ALA	1o.8	11	ARG	3.8	4
VAL	7.4	8	Cys	1.3	2
			Summe		87

6.5.1.2 Sequenzanalyse von GGβ CBpII

Das Peptid (1o6 Reste) wurde 5o Schritte automatisch abgebaut (Quadrolprogramm), von denen 48 identifiziert werden konnten. Die Reihenfolge dieser Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
VAL-ARG-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-LEU-THR-SER-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-LYS-ASN-
59                                  70
    20                  25                  30                  35
-LEU-ASP-ASN-ILE-LYS-ASN-THR-PHE-ALA-GLN-LEU-SER-GLU-LEU-HIS-CYS-ASP-LYS-
        80                                  90
             40                  45
-LEU-HIS-VAL-ASP-PRO-GLU-GLU-ASN-PHE-ARG-LEU-LEU
                 100                 106
```

6.5.2 Tryptische Peptide

Die Spaltung wurde mit nativen, oxidierten und CM-Ketten durchgeführt. Nur das oxidierte Material ließ sich bei pH 11 lösen. In den anderen Fällen wurden die Ketten in Suspension unter Rühren gespalten. Die Vortrennung über Sephadex wurde sowohl in alkalischen (Ammoniumbicarbonat, Abb. 18) als auch sauren (HAc, Abb. 17) Puffern durchgeführt. Der "Core"-Anteil wurde vorher am IP ausgefällt und getrennt chromatographiert.

6.5.2.1 Gelchromatographie, löslicher Anteil

Im alkalischen Puffer wurde eine sehr gute Trennung erhalten. Mehrere benötigte Peptide konnten aber nach der Chromatographie nicht mehr gefunden werden.

Bei Verwendung von o.1n HAc konnten in Gipfel-I- und Gipfel-IV-Fraktion die Peptide Tp5/6 und Tp14c/15 sauber isoliert und die Aminosäurenfolge automatisch vollständig bestimmt werden.

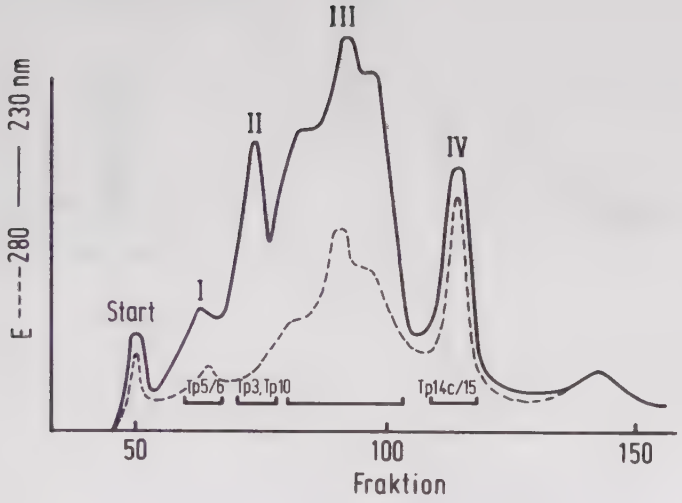


Abbildung 17

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (GGß), löslicher Anteil.

Bedingungen: Ansatz mit 2oomg oxidierten ß-Ketten; Sephadex G-25 fine; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase: o.1n HAc; Durchfluß:2oml/h; Fraktionsvolumen: 4-5ml.

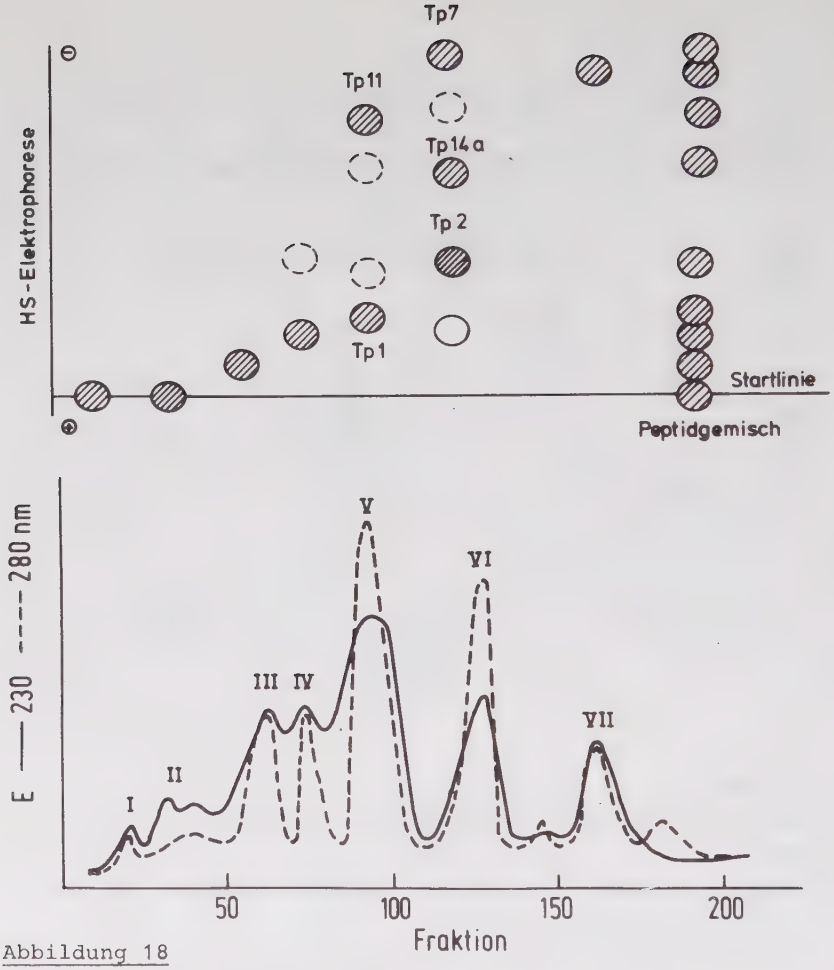


Abbildung 18

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (GGβ), löslicher Anteil und Analyse der Gipfelfraktionen mit HS-Elektrophorese und anschließenden Farbtesten (siehe exp. Teil). Anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, Farbreaktionen und homologen Vergleich (mit den β-Ketten des Huhns), konnten die Peptide einem bestimmten Kettenabschnitt zugeordnet werden (Tp1,..usw., siehe Abkürzungen).

Bedingungen Gelchromatographie: Ansatz mit 2ooomg nativen β-Ketten; Sephadex G-25 fine; Säulendimension: 15o x 2.5cm; mobile Phase: o.1n Ammoniumbicarbonat(pH 8.5); Durchfluß: 25ml/h; Fraktionsvolumen: 4-5ml.

Bedingungen HS-Elektrophorese: Whatmann Papier Nr1; Elektrophoresepuffer: o.o5m Pyridinacetat (pH 5.4); Elektrophoresezeit: 2 1/2h bei 3oooKv und 5o-9omA.

6.5.2.1.1 Bruttoformeln

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.5.2.1 isolierten tryptischen Peptide im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert fogendes Ergebnis:

	Tp5/6	Sequenz	Tp14c/15	Sequenz
ASX	2.14	2	-	-
THR	o.85	1	-	
SER	3.37	4	-	
GLX	-	-	-	
PRO	1.95	2	-	
GLY	2.o3	2	-	
ALA	o.98	1	-	
VAL	o.91	1	-	
ILE	o.98	1	-	
LEU	1.o3	1	-	
TYR	-	-	o.96	1
PHE	3.21	3	-	
LYS	-	-	1.o3	1
HIS	-	-	1.o1	1
ARG	o.95	1		
MET		1		
Summe		21		3

6.5.2.1.2 Sequenzanalysen

Die in Abschnitt 6.5.2.1 isolierten tryptischen Peptide wurden vollständig automatisch abgebaut und identifiziert. Die Reihenfolge dieser Aminosäuren ist:

Tp5/6 :
1 5 10
PHE-PHE-SER-SER-PHE-GLY-ASN-LEU-SER-SER-PRO-TYR-ALA-ILE-
41 50

15 20
LEU-GLY-ASN-PRO-MET-VAL-ARG
61

Tp14c/15:
1
LYS-TYR-HIS
144 146

6.5.2.2. Gelchromatographie,"Core"-Anteil

Der Rückstand der "Core"-Fällung wurde in o,1n HAc gelöst und über Sephadex getrennt. In Gipfel I konnte das ungespaltene ditryptische Peptid Tp12/13 nachgewiesen werden. Es konnte 2o Schritte im Sequenator (Propinprogramm I) abgebaut werden.

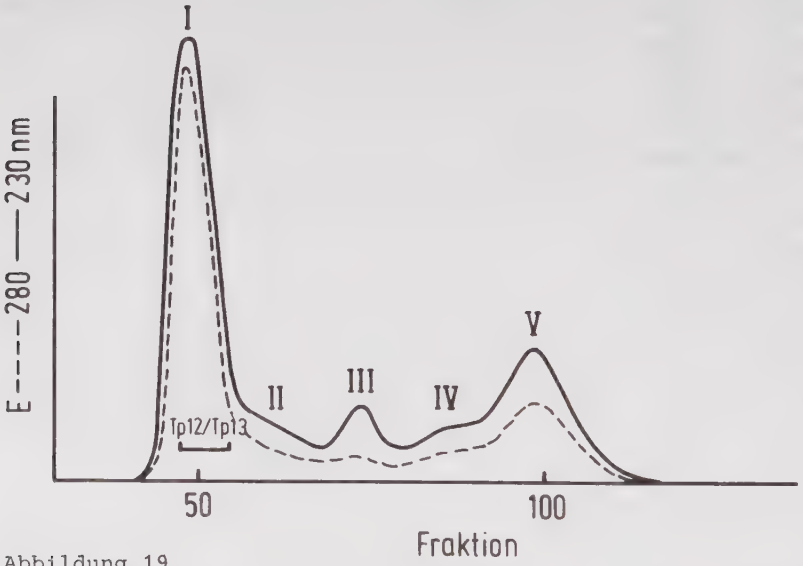


Abbildung 19

Gelchromatographische Trennung des "Core"-Anteils nach tryptischer Spaltung der oxidierten β-Ketten.
Bedingungen: Ansatz mit 2oomg oxidierte β-Ketten; Sephadex G-25 med.; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase: o.1n HAc; Durchfluß: 2oml/h; Fraktionsvolumen: 5-6ml.

6.5.2.2.1 Sequenz GGβ Tp12/13

Das Peptid (27 Reste) wurde 2o Schritte automatisch abgebaut (Quadrolprogramm). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
LEU-LEU-GLY-ASP-ILE-LEU-ILE-ILE-VAL-LEU-ALA-ALA-HIS-PHE-ALA-LYS-GLU-PHE-
105                 110                                         120
    20
THR-PRO
    124
```

6.5.2.2.2 Bruttoformel von GGß Tp12/13

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.5.2.2 isolierten Peptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	1.21	1	VAL	o.78	1
THR	o.87	1	ILE	2.1o	3
SER	o.14	-	LEU	4.32	4
GLX	3.78	4	PHE	2.18	2
PRO	o.95	1	LYS	2.o3	3
GLY	1.o3	1	HIS	o.98	1
ALA	4.89	5	CYS	o.75	1
Summe					27

6.5.2.3 Rechromatographie über Dowex 5o

Die Gipfelfraktionen II und III der Gelchromatographie (in HAc) des löslichen Anteils wurden zusammengefaßt, auf ca. 4-5ml einrotiert und die Peptide über Dowex 5o getrennt (Abb. 2o). In den Gipfelfraktionen II-IV, IX-XI und XIII konnten saubere Peptide isoliert werden. In Gipfel-VI-Fraktion wurde das freie Lysin mit direkter Aminosäureanalyse nachgewiesen. Die Gipfelfraktionen VII und VIII enthielten Aggregate verschiedener Peptide, die auch mit HS-Elektrophorese nicht getrennt werden konnten.

6.5.2.3.1 Sequenz der über Dowex 5o isolierten tryptischen Peptide von GGß

Die Aminosäurenfolge aller Peptide (Bruttoformeln Tab. 4) konnte vollständig automatisch bestimmt werden. Peptide mit C-terminalem Lysin wurden mit R IV umgesetzt und im Quadrolprogramm abgebaut, Peptide mit C-terminalem Arginin wurden direkt im Propinprogramm II sequenziert.

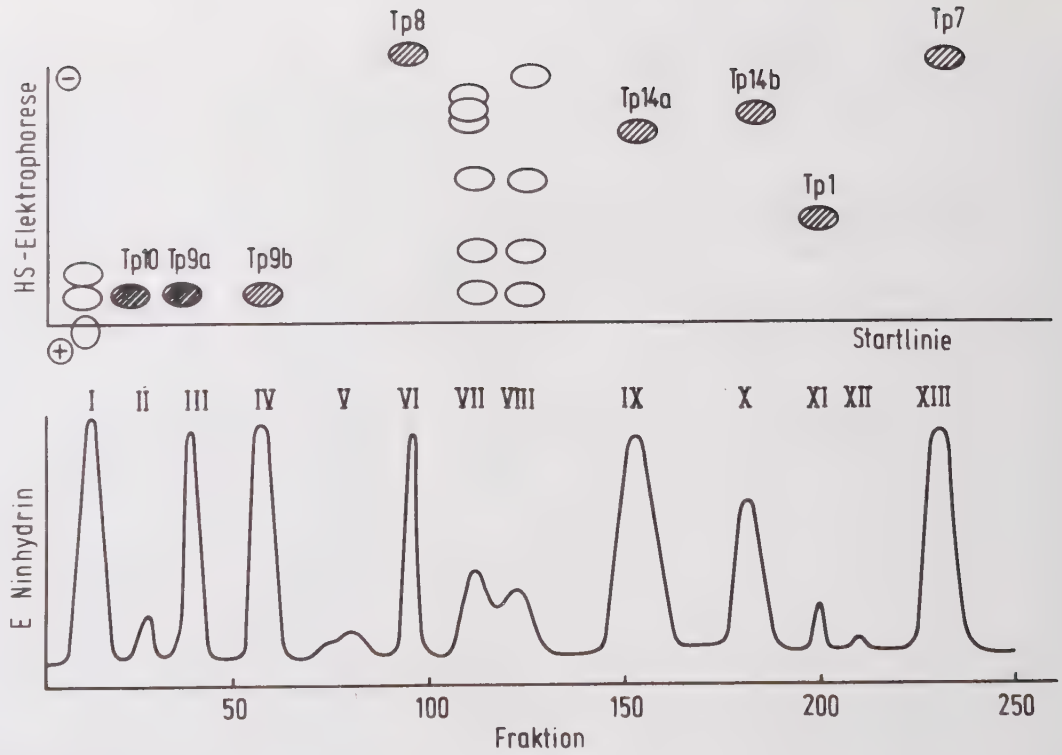


Abbildung 2o

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide (GGβ, von Gipfel-III-Fraktion der Gelchromatographie, Abb. 17). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, verschiedener Farbteste (siehe exp. Teil) und homologem Vergleich (mit den β-Ketten des Huhns), konnten die Peptide einem bestimmten Kettenabschnitt zugeordnet werden (Tp1, Tp2...usw., siehe Abkürzungen). Bedingungen Austauschchromatographie und Elektrophorese : siehe Abb. 14, Seite 3o.

Tabelle 4

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.5.2.3 isolierten tryptischen Peptide von GGβ im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	Tp1	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp1o	Tp14a	Tp14b
ASX	-	-	-	1.o2	2.89	2.o8	-	-
THR	-	-	-	o.95	-	o.88	-	-
SER	o.95	-	-	o.94	-	o.93	-	-
GLX	2.o3	-	-	-	-	2.14	-	-
PRO	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	-	1.o1	-	1.o1	-	-	-	-
ALA	1.o1	1.oo	-	1.o3	-	1.1o	-	3.o7
VAL	o.98	-	-	1.87	-	-	1.o1	1.53(2)
ILE	-	-	-	-	o.85	-	-	-
LEU	-	-	-	1.o1	1.21	2.o4	1.o2	1.14
TYR	-	-	-	-	-	-	-	-
PHE	-	-	-	o.98	-	o.98	-	-
LYS	1.o4	1.o2	1.oo	1.56(1)	1.16	1.o2	-	-
HIS	o.98	o.97	-	-	-	o.93	-	o.97
ARG	-	-	-	-	-	-	o.97	1.o4
CYS	-	-	-	-	-	o.78	-	-
TRP	1.oo	-	-	-	-	-	-	-
Summe	8	4	1	1o	6	13	3	8

```
          1
Tp7   :   ALA-HIS-GLY-LYS-
          61          64

          1               5                   10
Tp9a  :   VAL-LEU-THR-SER-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-LYS
          67          70                      76

          1               5
Tp9b  :   ASN-LEU-ASP-ASN-ILE-LYS
          77          80      82

          1               5                   10
Tp1o  :   ASN-THR-PHE-ALA-GLN-LEU-SER-GLU-LEU-HIS-CYS-ASP-LYS-
          83                            90                  95

          1
Tp14a :   LEU-VAL-ARG
          133     135

          1               5
Tp14b :   VAL-VAL-ALA-HIS-ALA-LEU-ALA-ARG
          136             140         143
```

6.5.3 Arginylpeptide von GGβ

Die SH-Gruppen der Ketten wurden mit JAA umgesetzt. Bei Blockierung der Lysinseitenketten mit MSA wurden sehr schlechte Ausbeuten erhalten (nur ca. 1o - 2o %). Erst nach Umsetzung mit 1oo-fachem Überschuß an MSA und einer Reaktionszeit von über 1o h konnten Ausbeuten von ca. 9o % erhalten werden.

Nach Spaltung mit Trypsin konnten alle Peptide durch Gelfiltration isoliert werden (Abb. 21). Dies war überraschend, da mit den Peptiden Ap1 und Ap5 zwei gleichgroße Bruchstücke (3o und 31 Reste) vorlagen, die sich nach der Theorie auf diese Weise nicht trennen lassen sollten.

Das Peptid Ap5 wurde in Gipfel-I-Fraktion nachgewiesen. Aufgrund seiner hydrophoben Zusammensetzung könnte das Peptid Ap5 (31 Reste) mit sich selbst Aggregate gebildet haben. Diese konnten nicht in die Matrix des Trägers eindringen und

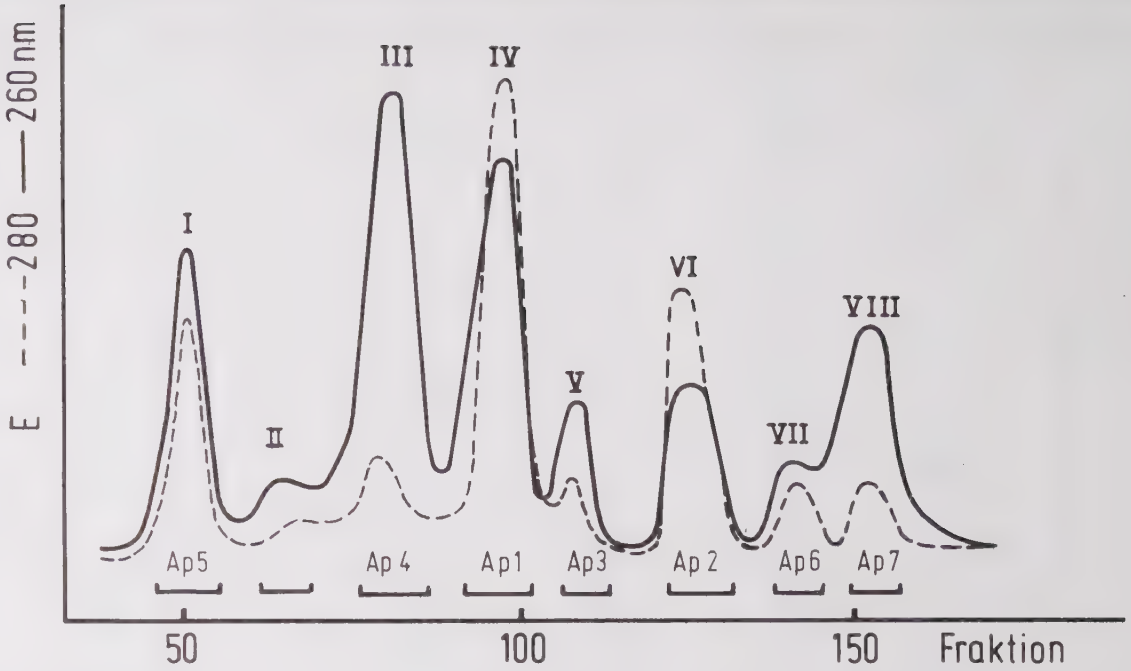


Abbildung 21

Gelchromatographische Trennung der ARG-Peptide nach limitiert-tryptischer Spaltung der CM-Ketten von GGß. Mit nur einer Chromatographie konnten alle Peptide isoliert werden. In Gipfel-I-Fraktion ist überraschend das Ap5 -Peptid (31 Reste) enthalten, das nach seiner Größe in Gipfel-IV-Fraktion zusammen mit dem Ap3-Peptid (3o Reste) erwartet wurde.
Bedingungen: Ansatz mit 2oomg CM-ß-Ketten; Sephadex G-5o med.; Säulendimension: 13o x 2.5cm; mobile Phase: o.1m Tris/HCl (pH 8.5) in 6m Guanidin.HCl; Durchfluß: 2oml/h; Fraktionsvolumen: 4ml.

Tabelle 5

Nach Hydrolyse (in 6n HCl,2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.5.3 isolierten ARG-Peptide im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	Ap1	Ap2	Ap3	Ap4	Ap5	Ap6	Ap7	Summe Sequ.
ASX	2.o3	-	2.o8	7.56(8)	1.o8	-		12.75(13)
THR	o.94	o.98	o.93	1.93	o.84	-	-	5.62(6)
SER	o.93	-	3.65	1.9o	-	-	-	6.48(7)
GLX	4.o8	1.o1	-	3.14	4.o6	-	-	12.29(12)
PRO	-	o.93	2.o1	o.95	o.92	-	-	4.81(5)
GLY	3.1o	-	2.o9	2.21	1.24	-	-	8.64(8)
ALA	5.o3	-	1.14	3.17	5.13	3.o8	-	17.55(17)
VAL	2.88	o.87	1.o1	2.94	1.45(2)	1.91	-	11.o6(12)
ILE	o.91	o.85	o.95	o.96	1.89(3)	-	-	5.56(7)
LEU	3.14	2.13	2.o3	4.85	5.32	1.13	-	18.6o(18)
TYR	-	o.94	-	-	-	-	o.95	1.89(2)
PHE	-	-	3.o2	2.88	2.o3	-	-	7.93(8)
LYS	2.o1	-	-	5.o3	2.12	-	1.o3	1o.19(1o)
HIS	o.96	-	-	2.94	o.96	o.97	1.o2	7.15(7)
ARG	1.o1	o.98	1.o2	o.99	1.o1	1.o3	-	6.o4(6)
MET	-	-	o.75	-	-	-	-	o.75(1)
TRP	- (2)	- (1)	-	-	- (1)	-	-	(4)
CYS	o.74	-	-	o.63(1)	o.82	-	-	2.19(3)
Summe	3o	1o	21	43	31	8	3	146

ermöglichten so eine Elution mit den Fraktionen der Ausschlußgrenze. In den Gipfelfraktionen III-VIII wurden die übrigen sechs Peptide in reiner Form isoliert.

6.5.3.1 Sequenz der Arginylpeptide von GGβ

Die Peptide Ap3 und Ap5 wurden vollständig, Ap4 teilweise (2o Reste) automatisch (Propinprogramm II) analysiert (Bruttoformeln Tabelle 5). Die restlichen Bruchstücke wurden nicht verwertet, da die Sequenzen bekannt waren.

Die mit MSA umgesetzten Seitenketten der Lysine wurden zur Sequenzierung nicht deblockiert. Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
        1                   5                  10                  15
Ap3 :   PHE-PHE-SER-SER-PHE-GLY-ASN-LEU-SER-SER-PRO-THR-ALA-ILE-LEU-
        41                                     50
                        20
       -GLY-ASN-PRO-MET-VAL-ARG
                           61

        1                   5                  10                  15
Ap4 :   ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-LEU-THR-SER-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-LYS-ASN-
        62                                 70
                    20
       -LEU-ASP-ASP-ILE
                    81

        1                   5                  10                  15
Ap5 :   LEU-LEU-GLY-ASP-ILE-LEU-ILE-ILE-VAL-LEU-ALA-ALA-HIS-PHE-ALA-LYS-
        105                 110                                     120
                        20                  25                  30
       -GLU-PHE-THR-PRO-GLU-CYS-GLN-ALA-ALA-TRP-GLN-LYS-LEU-VAL-ARG
                                           130                 135
```

6.6 ZUSAMMENFASSUNG GRAUGANS

α- Ketten

Die tryptischen Peptide (außer den "Core"-Peptiden) konnten leicht und einfach isoliert werden. Durch Änderung des Gradienten könnte es möglich sein, alle Peptide schon über Dowex 5o zu trennen. Das APpII Peptid erwies sich als wertvolle Hilfe, das "Core"-Problem zu lösen. Die besten Ausbeuten wurden bei Spaltung der nativen Ketten erhalten. Als schwierig erwiesen sich die Aufklärung der C-terminalen 2o Reste der Ketten. Eine Reihe von Versuchen β 127 LYS mit Trypsin zu spalten, führte zu keinem Erfolg (ASP-LYS Sequenz). Es wurde ein Weg gefunden, das Peptid APpII zu denaturieren und zu lösen, um eine Nachspaltung mit Protease Aureus zu ermöglichen. Umsetzungen mit sulfonierten Senfölen erwiesen sich als ungeeignet.

β- Ketten

Die Spaltung der oxidierten β-Ketten mit Trypsin war ungünstig. Die verschiedensten Abbauprodukte der oxidierten Tryptophanpeptide waren durch starke Aggregationsneigung in sämtlichen Peptidfraktionen des Dowex 5o-Laufes vertreten. Für zukünftige Spaltungen wurde konzipiert, die Cystein-Reste des nativen Proteins erst nach Auftrennung zu modifizieren, die Gipfelfraktionen der Gelfiltration aufzuteilen,
und getrennt über Dowex 5o zu chromatographieren. Der "Core"-Bereich konnte nur als unreines ungespaltenes ditryptisches Peptid isoliert werden. Es konnte nur wenige Schritte sequenziert werden. Das "Core"-Problem wurde hier mit Isolierung des Peptids Ap5 gelöst, das den gesamten Bereich erfaßt. Spaltungen mit Protease Aureus (mit sulfonierten Senfölen umgesetzten Ketten) auf die viel Zeit verwendet wurde, waren erfolglos. β 12o LYS konnte mit Trypsin nicht gespalten werden (LYS-GLU Sequenz).

6.6.1 Übersicht der Sequenzanalyse von GG α/β

Es wird angegeben, wieviel Reste vom N-Terminus der jeweiligen Ketten (aus Abschnitt 5.3.2) oder Peptide der α- und β-Ketten (aus Abschnitt 6.4 und 6.5) im Sequenator abgebaut und in welcher Zusammenstellung der Ergebnisse die Primärstrukturen der α- und β-Ketten erhalten wurden (siehe auch Abschnitt 7.1).

Sequenzanalyse der Kettenabschnitte die ausreichen, die Primärstruktur darzustellen.			Bestätigung der Primärstruktur durch zusätzlich analysierte Peptide.		
abgebaute Reste	Peptid Protein	Zahl der Reste	abgebaute Reste	Peptid	Zahl der Reste
α - Ketten					
1 - 6o	Ketten	141	1 - 7	Tp1	7
			12 - 16	Tp3	5
33 - 92	CBpII	1o9	31 - 4o	Tp5	9
			41 - 56	Tp6	16
			57 - 6o	Tp7	4
			62 - 82	Tp9a	21
			83 - 9o	Tp9b	8
			91 - 92	Tp1o	2
93 - 99	Tp11	7			
95 -129	APpII	47	1oo -123	Tp12/13	4o
121 -141	APpIIGpII	21	14o- 141	Tp14	2
β- Ketten					
1 - 45	Ketten	146			
41 - 61	Tp5/6	21	41 - 61	Ap3	21
6o -1o6	CBpII	87	62 - 64	Tp7	4
			62 - 81	Ap4	43
			67 - 76	Tp9a	1o
			77 - 82	Tp9b	6
			83 - 95	Tp1o	13
1o5 -135	Ap5	31	1o5 -124	Tp12/13	28
133 -135	Tp14a	3			
136 -143	Tp14b	8			
144 -146	Tp14c/15	3			

6.7 STREIFENGANS, α-KETTEN

6.7.1 Bromcyanpeptide

Die Spaltung der Ketten und Isolierung der Peptide wurde wie bei der Graugans durchgeführt (Abschnitt 6.4.1).

6.7.1.1 Bruttoformel von SGα CBpII

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.7.1 isolierten Bromcyanpeptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	8.59	8	ILE	3.o7	4
THR	5.91	6	LEU	11.51	12
SER	4.47	5	TYR	2.58	3
GLX	6.23	6	PHE	7.3o	7
PRO	3.86	4	LYS	9.11	9
GLY	5.12	5	HIS	8.75	9
ALA	15.74	15	ARG	1.74	2
VAL	11.28	12	CYS	1.62	2
Summe					1o9

6.7.1.2 Sequenz von SGα CBpII

Das Peptid wurde 45 Schritte automatisch abgebaut (Quadrolprogramm). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
PHE-THR-ALA-TYR-PRO-GLN-THR-LYS-THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-GLN-HIS-
33                                40                                  50

    20                  25                  30                  35
-GLY-SER-ALA-GLN-ILE-LYS-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-VAL-ALA-ALA-LEU-VAL-GLU-
                                    60

            40                  45
-ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-ILE-ALA
    70                      77
```

In α63 VAL wurde der zweite Austausch zur Graugans gefunden.

6.7.2 Tryptische Peptide

Im Gegensatz zu den bei der Graugans durchgeführten Untersuchungen, wurde hier von nativen Ketten ausgegangen. Das "Core" wurde ausgefällt und verworfen, da dieser Bereich mit dem Peptid APpII erfaßt werden kann.

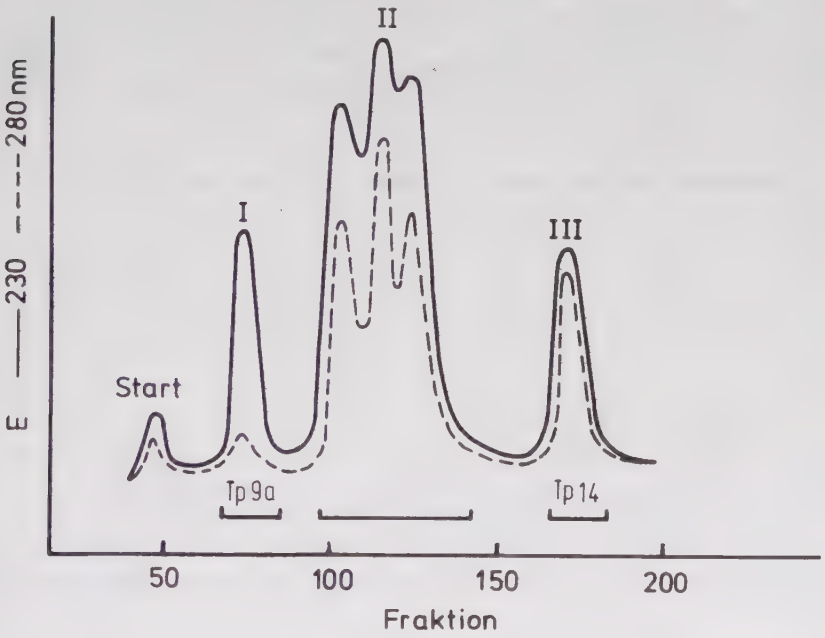


Abbildung 22

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (SGα, löslicher Anteil). In den Gipfelfraktionen I und III sind saubere Peptide enthalten, während in Gipfel-II-Fraktion die übrigen Peptide gefunden werden.
Bedingungen: wie in Abb. 12, Seite 29.

6.7.2.1 Rechromatographie über Dowex 5o

Die Gipfel-II-Fraktion wurde eingeengt und auf den Austauscher adsorbiert. Mit einem flacheren Gradienten wurde eine bessere Trennung als in Abb.14 (GG) erhalten. Die Peptide Tp3 und Tp9b konnten auf der Säule isoliert werden (Abb. 23). Tp1 und Tp11 wurden mit präparativer HS-Elektrophorese von Tp5 getrennt.

Sequenz der tryptischen Peptide

Alle Peptide konnten vollständig abgebaut werden. Lysinpeptide wurden mit R IV umgesetzt und im Quadrolprogramm, Arginylpeptide im Propinprogramm automatisch sequenziert. Die Aminosäurenfolge der Peptide Tp5, Tp6, Tp7, Tp9b, Tp1o, Tp11 und Tp14 war identisch mit den tryptischen Peptiden der Graugans (Abschnitt 6.4.2.3). Mit dem Abbau von Tp4 wurde der Austausch α18 SER der N-terminalen Sequenzierung (Abschn. 5.3.2) bestätigt.

Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren bei Peptid Tp9a ist:

```
          1                5                  10                  15
Tp9a :  VAL-VAL-ALA-ALA-LEU-VAL-GLU-ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-ILE-
        62                                   70

                        20
      -ALA-GLY-ALA-LEU-SER-LYS
                  80    82
```

Im Peptid Tp9a wurde mit α63 VAL der zweite Austausch der α-Ketten gefunden. Zur Bestätigung wurde dieses Peptid ein zweites Mal ohne R I im Propinprogramm 1o Schritte automatisch abgebaut.

6.7.3 ASP-PRO-Peptide

Die nativen Ketten wurden unter gleichen Bedingungen wie bei der Graugans gespalten. Das Chromatogramm war identisch und das APpII konnte im gleichen Gipfel isoliert werden (Abb. 15). Im Gegensatz zur Graugans konnte das Peptid APpII durch Verbesserungen am Sequenatorprogramm vollständig abgebaut werden (Propinprogramm I).

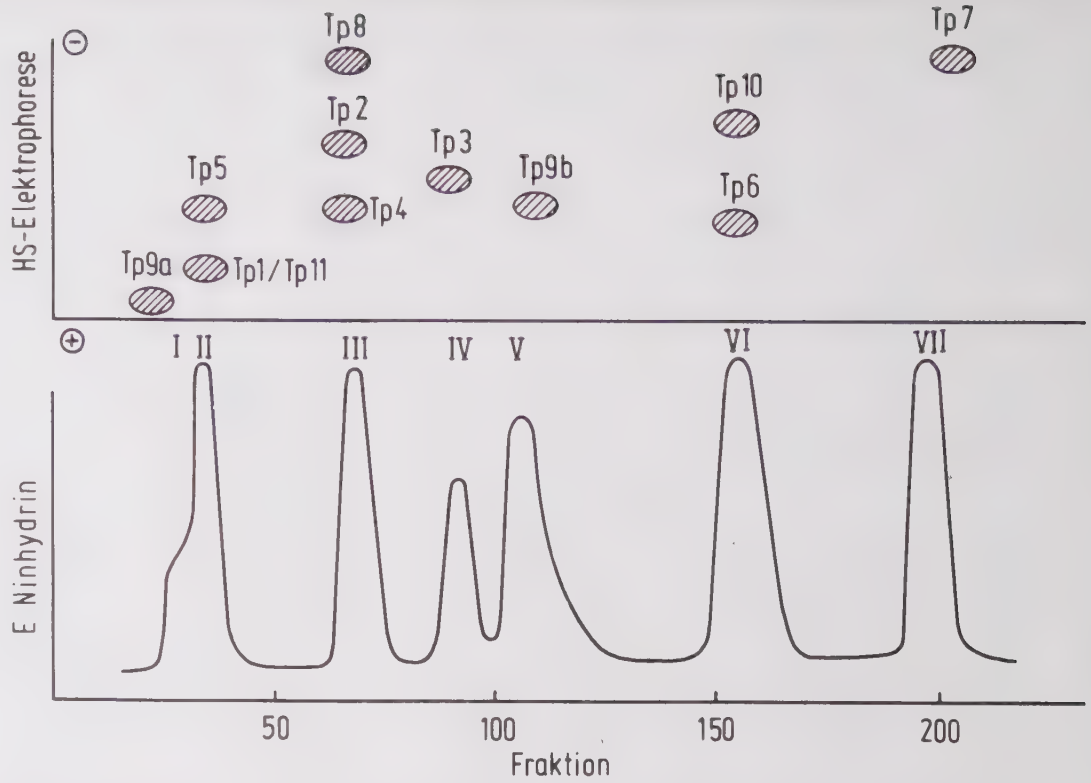


Abbildung 23

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide (SGα) von Gipfel-II-Fraktion der Gelchromatographie (Abb. 22). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Die Zuordnung erfolgte wie in Abb.14, Seite 3o. Bedingungen Austauschchromatographie und HS-Elektrophorese wie in Abb.14, Seite 3o.

6.7.3.1 Bruttoformel von SGα APpII

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.7.3 isolierten Peptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	2.o8	2	ILE	o.79	1
THR	2.64	3	LEU	6.14	6
SER	2.11	2	TYR	o.76	1
GLX	1.o7	1	PHE	3.93	4
PRO	1.82	2	LYS	3.oo	3
GLY	2.o3	2	HIS	3.92	4
ALA	6.29	6	ARG	1.o1	1
VAL	5.84	7	CYS	1.67	2
Summe					47

6.7.3.2 Sequenz von SGα APpII

Das Peptid (47 Reste) wurde vollständig abgebaut (Propinprogramm I) und die Aminosäuren identifiziert. Die Reihenfolge der Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
PRO-VAL-ASN-PHE-LYS-PHE-LEU-GLY-HIS-CYS-PHE-LEU-VAL-VAL-VAL-ALA-ILE-HIS-
95                    100                                 110

    20                  25                  30                  35
-HIS-PRO-SER-ALA-LEU-THR-ALA-GLU-VAL-HIS-ALA-SER-LEU-ASP-LYS-PHE-LEU-CYS-
                   120                                             130

            40                  45
-ALA-VAL-GLY-THR-VAL-LEU-THR-ALA-LYS-TYR-ARG
                                     141
```

In α119 ALA wurde der dritte und letzte Austausch zur Graugans gefunden.

6.8 STREIFENGANS, β-KETTEN

6.8.1 Bromcyanpeptide

Das Peptid CBpII wurde wie in Abschnitt 6.5.1 (GG) gewonnen. Das Peptid wurde 4o Schritte automatisch abgebaut (Quadrolprogramm).

Es wurde kein Unterschied zur Graugans gefunden (Abschnitt 6.5.1.1). Die Bruttoformel zeigte nur geringfügige Abweichungen.

6.8.2 Tryptische Peptide

Die nativen Ketten wurden in Suspension gespalten. Das "Core" wurde abgetrennt und verworfen. Die Peptide des löslichen Anteils wurden über Sephadex getrennt (Abb. 24). Die Gipfelfraktionen der Gelfiltration wurden mit HS-Elektrophorese auf Einheitlichkeit geprüft (Abb. 24). In Gipfel-VII-Fraktion konnte das Peptid Tp4 isoliert werden. In den Gipfelfraktionen II-IV waren mehrere Peptide enthalten. Die präparative Trennung mit HS-Elektrophorese der in den Gipfelfraktionen II-IV enthaltenen Peptide gelang nur teilweise. Nach einem erneuten Ansatz wurde jede Gipfelfraktion einzeln über Dowex 5o rechromatographiert (Abb. 25-29). Die Gipfelfraktionen II-IV der Gelfiltration wurden bis zur Trockene einrotiert und der Rückstand mit PAS behandelt, um die Seitenketten der Cysteine zu oxidieren. Es konnten alle Peptide (außer den "Core"-Peptiden) isoliert werden. Die Peptide wurden automatisch abgebaut. Es konnte kein Aminosäureaustausch zu den β-Ketten der Graugans (Abschnitt 6.5.2) gefunden werden.

6.8.3 Arginylpeptide

Die Seitenketten der Lysine wurden wie bei der Graugans mit MSA blockiert. Die blockierten CM-Ketten wurden mit Trypsin gespalten und die Peptide über Sephadex isoliert. Das Chromatogramm war identisch mit dem der Graugans (Abb. 21). In Gipfel I wurde das Peptid Ap5 isoliert.

Die Bruttoformel wies auf einen Austausch GLU → ASP hin. Das Peptid Ap5 wurde automatisch vollständig abgebaut (Propinprogramm II). In β 125 ASP wurde der einzige Unterschied zur β-Kette der Graugans gefunden (Abschnitt 6.5.3.1).

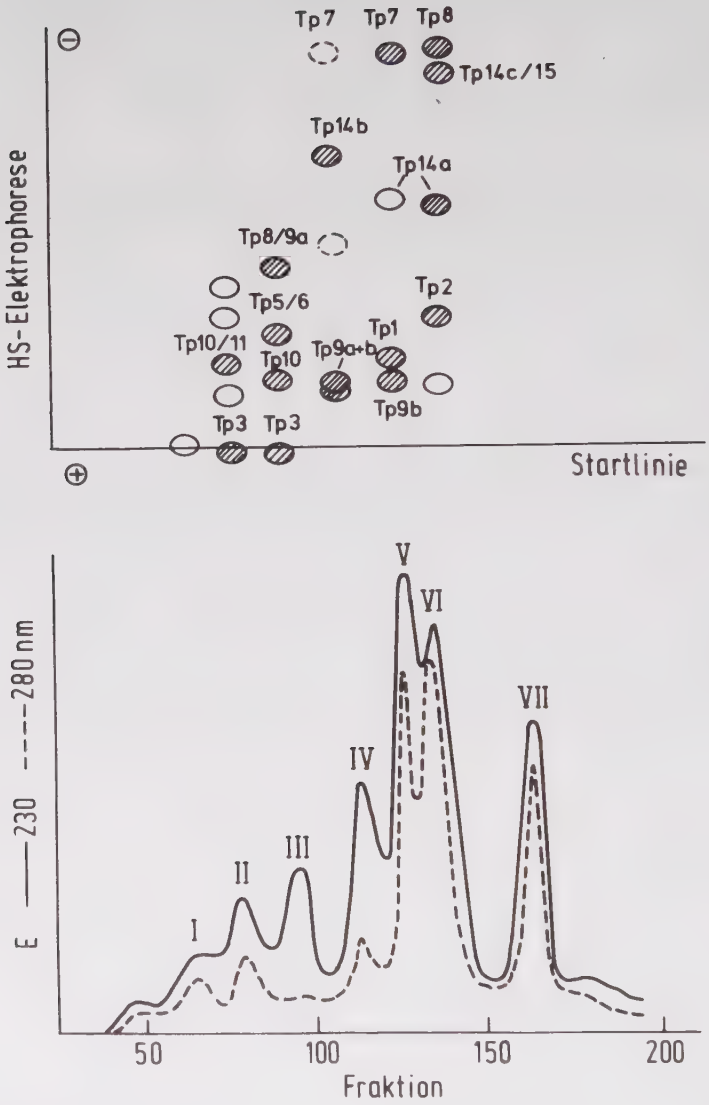


Abbildung 24

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (SGβ, löslicher Anteil). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht (Zuordnung wie in Abb.18, Seite 42).
Bedingungen Gelchromatographie in Abb.12, Seite 29
Bedingungen HS-Elektrophorese wie in Abb.18, Seite 42).

Abbildungen 25 - 29

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide (SGβ) von den Gipfelfraktionen II-VI der Gelchromatographie (Abb. 24, Seite 6o). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, verschiedener Farbteste (siehe exp. Teil), Bestimmung der Bruttoformeln (siehe Tab. 6, Seite 64) und homologem Vergleich (mit den β-Ketten der Graugans), konnten die Peptide einem bestimmten Kettenabschnitt zugeordnet werden (Tp1, Tp2...usw., siehe Abkürz.)
Bedingungen Austauschchromatographie: Dowex 5o X2; Säulendimension: o.6 x 4ocm; Startpuffer: o.oo2m Pyridinacetat (pH 2.8); 1.Gradient: o.o6 Pyridinacetat (pH 3.3); 2.Gradient: o.6m Pyridinacetat (pH 3.35); 3.Gradient: 2m Pyridinacetat (pH 6.o); Durchfluß: 15-2oml/h; Fraktionsvolumen: 3-5ml.
Bedingungen HS-Elektrophorese: Whatmann-Papier Nr.1; Elektrophoresepuffer: o.o5m Pyridinacetat (pH 5.4); Elektrophoresezeit: 2 1/2h bei 3oooKV und 5o-9omA.

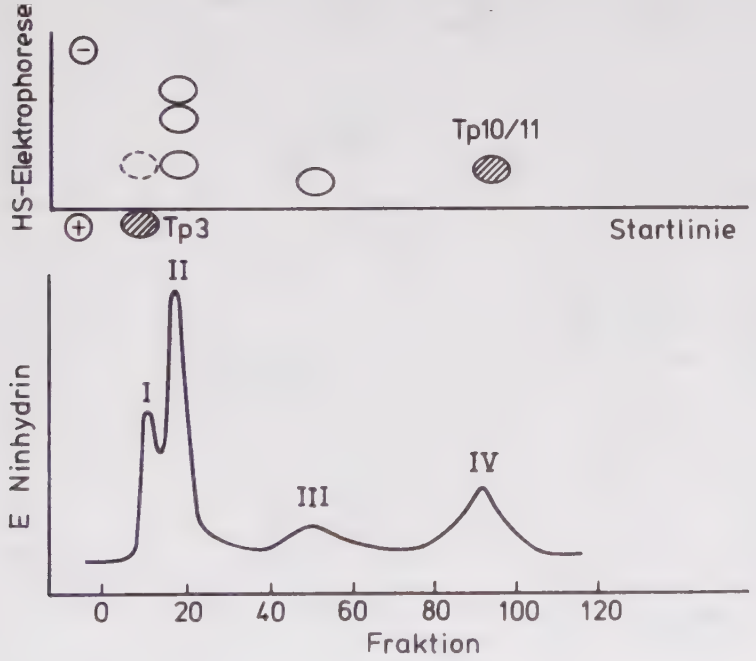
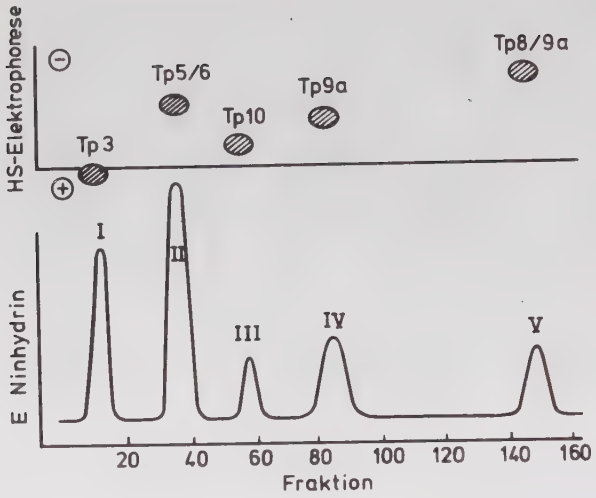
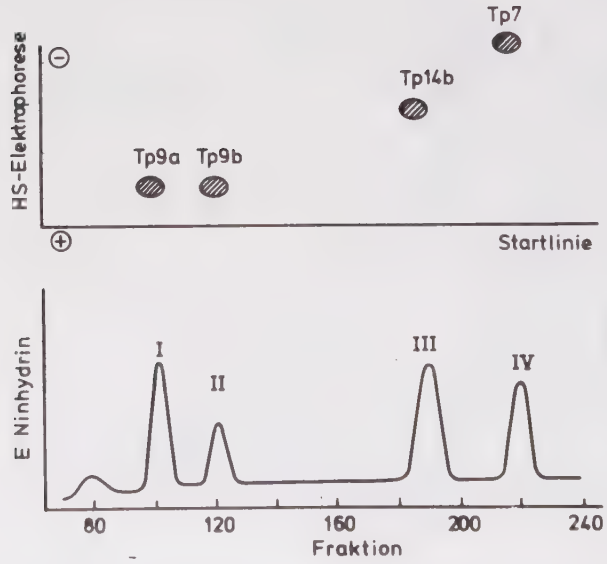


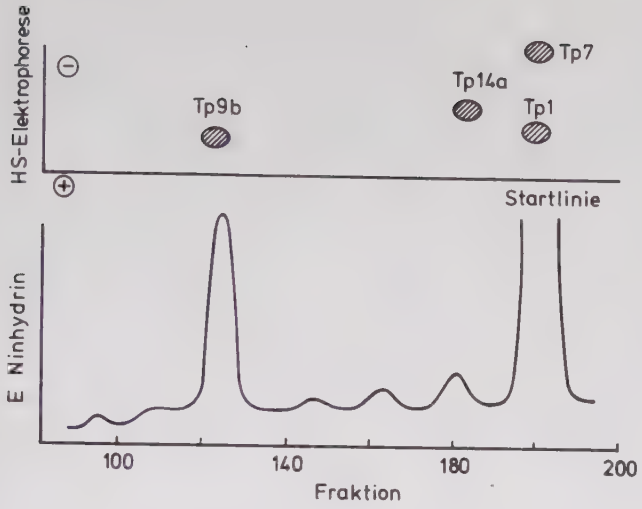
Abbildung 25
Rechromatographie über Dowex 5o von Gipfel-II-Fraktion.
Legende und Bedingungen siehe oben.

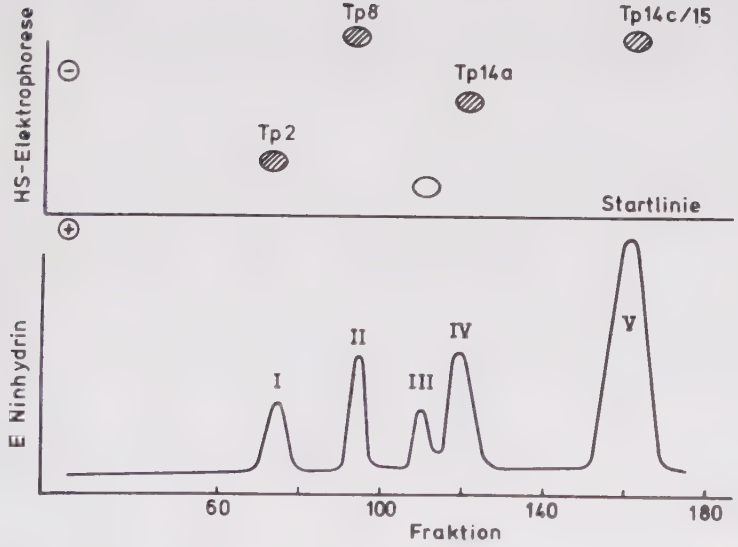




Abbildungen 28(oben) und 29(unten)

Rechromatographie über Dowex 5o von Gipfel-III-Fraktion (oben) und Gipfel-IV-Fraktion (unten).
Legende und Bedingungen siehe Seite 61, oben.





Abbildungen 26(oben) und 27(unten)

Rechromatographie über Dowex 5o von Gipfel-V-Fraktion (oben) und Gipfel-VI-Fraktion (unten).
Legende und Bedingungen siehe Seite 61, oben.

Tabelle 6

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.8.2 isolierten tryptischen Peptide von SGß im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5/6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp1o	Tp1o/11	Tp14a	Tp14b	Tp14c/15
ASX	-	-	2.o1	-	2.o4	-	-	1.o8	2.63	2.o5	3.69	-	-	-
THR	-	o.86	-	o.74	o.98	-	-	1.o1	-	o.95	o.91	-	-	-
SER	o.91	-	-	-		-	-	1.o1	-	o.95	o.86	-	-	-
GLX	2.o7	1.o3	1.14	1.o8	-	-	-	-	-	2.o3	2.99	-	-	-
PRO	-	-	-	o.94	1.86	-	-	-	-	-	o.93	-	-	-
GLY	-	2.14	o.97	-	2.23	1.o4	-	o.98	-	-	-	-	-	-
ALA	1.15	-	4.o7	-	1.16	1.o1	-	1.14	-	1.o4	1.13	-	3.32	-
VAL	1.o1	-	1.98	o.87	o.95	-	-	1.76	-	-	o.97	o.98	1.61	-
ILE	-	o.98	-	o.85	o.93	-	-	-	o.83	-	-	-	-	-
LEU	-	2.o9	1.o3	2.21	2.o7	-	-	o.99	1.31	2.o1	3.21	1.o3	1.18	-
TYR	-	-	-	o.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o.95
PHE	-	-	-	-	2.89	-	-	o.97	-	o.99	1.94	-	-	-
LYS	1.oo	1.o4	-	-	-	1.oo	1.oo	1.21	1.23	1.oo	o.96	-	-	1.o4
HIS	o.99	-	-	-	-	o.95	-	-	-	1.o3	1.97	-	1.o3	1.o1
ARG	-	-	1.o1	1.o3	o.97	-	-	-	-	-	o.94	1.oo	1.o1	-
MET	-	-	-	-	o.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRP	1.oo	1.oo	-	1.oo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	o.94	-	-	-	-	-	-	o.65	o.87	-	-	-
Summe	8	9	13	1o	21	4	1	1o	6	13	22	3	8	3

6.9 ZUSAMMENFASSUNG, STREIFENGANS

α- Ketten

Da auf überlappende Spaltungen verzichtet werden kann (große Ähnlichkeit der Ketten, homologe Zuordnung), ist es möglich, die Primärstruktur der α-Ketten mit nur zwei Spaltungsmethoden aufzuklären (tryptische und ASP-PRO-Spaltung). Nachspaltungen waren nicht erforderlich, da das Peptid APpII vollständig abgebaut werden konnte. Das Bromcyanpeptid CBpII wurde nicht benötigt, da in jedem Fall eine tryptische Spaltung durchgeführt werden muß, um den mittleren Bereich der Ketten (6o - 1oo) zu erfassen. Bei der Isolierung dieser Peptide werden ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand auch die Peptide erhalten, welche eine Aufklärung der Primärstruktur zwischen α 4o und α 6o ermöglichen. Die Verwendung von oxidierten Ketten (Löslichkeit) erwies sich als günstig. Durch einen flacheren Gradienten als dem bei der Graugans angewandten, konnten Tp3 und Tp9b schon bei der Austauschchromatographie über Dowex 5o getrennt werden.

β- Ketten

Bei homologer Zuordnung ist es auch hier möglich, ebenso wie bei den α-Ketten mit nur zwei Spaltmethoden auszukommen (tryptische und limitiert-tryptische Spaltung und auf die Isolierung von Bromcyanpeptid CBpII zu verzichten. Vorteilhaft war die Verwendung der nativen Ketten zur tryptischen Spaltung. Hier wurden nur die CYS-haltigen Peptide nach Gelfiltration und vor Rechromatographie (Dowex 5o) oxidiert. Als günstig erwies sich die einzelne Rechromatographie der Gipfel der Gelfiltration.

6.9.1 Übersicht der Sequenzanalyse von SG α/β

Es wird angegeben, wieviel Reste vom N-Terminus der jeweiligen Ketten (aus Abschnitt 5.3.2) oder Peptide der α- und β-Ketten (aus Abschnitt 6.7 und 6.8) im Sequenator abgebaut und in welcher Zusammenstellung der Ergebnisse die Primärstrukturen der α- und β-Ketten erhalten wurden (siehe auch Abschnitt 7.1).

Sequenzanalyse der Kettenabschnitte die ausreichen, die Primärstruktur darzustellen			Bestätigung der Primärstruktur durch zusätzlich analysierte Peptide		
abgebaute Reste	Peptid Protein	Zahl der Reste	abgebaute Reste	Protein	Zahl der Reste
α - Ketten					
1 - 4o	Ketten	141	17 - 3o	Tp4	15
			32 - 4o	Tp5	9
33 - 77	CBpII	1o9	41 - 56	Tp6	16
			57 - 6o	Tp7	4
62 - 82	Tp9a	21			
83 - 9o	Tp9b	8			
91 - 92	Tp1o	2			
93 - 99	Tp11	7			
95 - 141	APpII	47	14o - 141	Tp14	2
β - Ketten					
1 - 45	Ketten	146			
41 - 61	Tp5/6	21			
6o - 99	CBpII	87	62 - 65	Tp7	4
			67 - 76	Tp9a	1o
			77 - 82	Tp9b	6
83 - 1o4	Tp1o/11	22			
1o5 - 135	Ap5	31	1o5 - 122	Tp12/13	28
			133 - 135	Tp14a	3
136 - 143	Tp14b	8			
144 - 146	Tp14c/15				

6.1o STRAUSS, α-Ketten

6.1o.1 Tryptische Peptide

Die Spaltung wurde mit oxidierten Ketten durchgeführt. Es ließ sich kein "Core" ausfällen. Das Peptidgemisch wurde über Sephadex chromatographiert. In den Gipfelfraktionen II und IV konnten zwei Peptide Tp9a und Tp14 analysenrein isoliert werden. In den Gipfelfraktionen I und Ia waren "Core"-Peptide enthalten, die verworfen wurden.

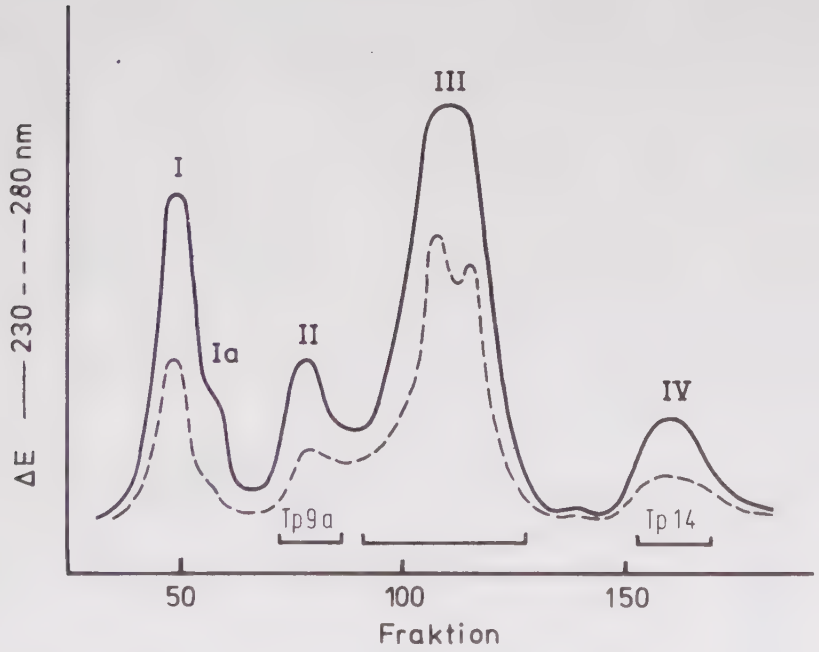


Abbildung 3o

Gelchromatographie der tryptischen Peptide (STα). In den Gipfelfraktionen I und Ia sind die"Core"-Peptide, II und IV die Peptide Tp9a und Tp14 und in Gipfelfraktion III die restlichen tryptischen Peptide enthalten.
Bedingungen: wie in Abb. 12, Seite 29.

6.1o.1.1 Rechromatographie über Dowex 5o

Die Gipfel-III-Fraktion der Gelfiltration (Abb. 3o) wurde eingeengt und über Dowex 5o analysiert (Abb. 31). Durch einen besonders flachen Gradienten konnten alle Peptide (Außer Tp5 und Tp11 in Gipfel-III-Fraktion) isoliert werden.

6.1o.1.2 Sequenz der tryptischen Peptide von STα

Alle Peptide konnten vollständig abgebaut und identifiziert werden (Bruttoformeln Tab. 7). Lysinpeptide wurden mit R IV umgesetzt und im Quadrolprogramm **automatisch** sequenziert, Arginylpeptide wurden direkt automatisch abgebaut. Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
          1               5
Tp5   :   MET-PHE-ILE-THR-TYR-PRO-GLN-THR-LYS
          32                              40

          1               5                   10
Tp6   :   THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-HIS-HIS-GLY-SER-ALA-GLN-
          41                                  50

          15
          ILE-LYS
              56

          1
Tp7   :   ALA-HIS-GLY-LYS
          53        56

          1               5                   10
Tp9a  :   VAL-ALA-ASN-ALA-LEU-ILE-GLU-ALA-VAL-ASN-HIS-ILE-ASP-ASP-
          62                              70

          15                  20
          ILE-SER-GLY-ALA-LEU-SER-LYS
                              80    82

          1               5
Tp9b  :   LEU-SER-ASP-LEU-HIS-ALA-GLN-LYS
          83                          90

          1
Tp1o  :   LEU-ARG
              91

          1               5
Tp11  :   VAL-ASP-PRO-VAL-ASN-PHE-LYS
          93                      99

          1
Tp14  :   TYR-ARG
              141
```

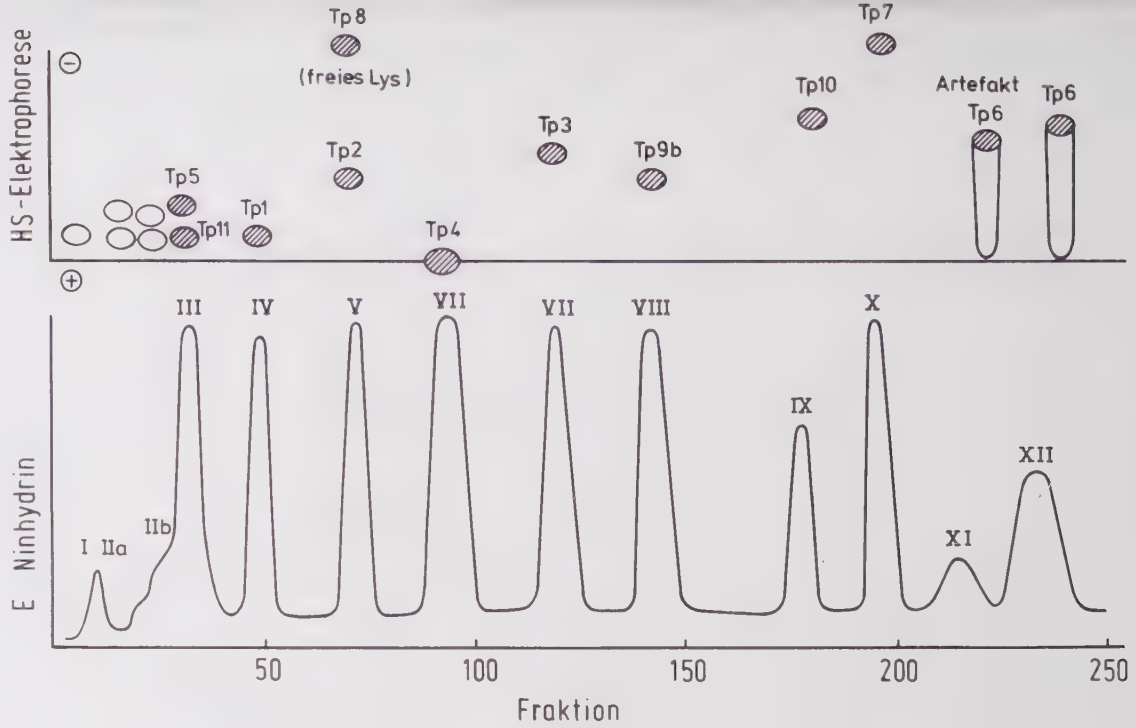


Abbildung 31

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide (STα, von Gipfel-II-Fraktion der Gelchromatographie Abb. 3o). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Die Zuordnung erfolgte wie in Abb. 14, Seite 3o.
Bedingungen Austauschchromatographie: Dowex 5o X2; Säulendimension: o.6 x 6ocm; Startpuffer: o.o2 Pyridinacetat (pH 3.o); 1.Gradient: o.6m Pyridinacetat (pH 3.35); 2.Gradient: 2m Pyridinacetat (pH 6.o); Durchfluß: 15ml/h; Fraktionsvolumen: 4-5ml.
Bedingungen HS-Elektrophorese: wie in Abb. 14, Seite 3o.

Tabelle 7

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.1o.1 isolierten tryptischen Peptide von STα im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp1o	Tp11	Tp14
ASX	1.15	1.o3	-	-	-	1.o7	-	-	3.88	1.o4	-	2.13	-
THR	1.o3	o.96	-	o.96	1.94	o.91	-	-	-	-	-	-	-
SER	o.94	-	o.96	1.81	-	o.86	-	-	1.91	o.97	-	-	-
GLX	-	-	-	3.76	1.o4	1.o8	-	-	1.14	1.o8	-	1.21	-
PRO	-	-	-	-	o.96	o.92	-	-	-	-	-	-	-
GLY	o.97	-	o.98	o.96	-	1.o6	1.o3	-	1.o9	-	-	-	-
ALA	-	-	-	1.98	-	1.o3	o.98	-	3.89	1.oo	-	-	-
VAL	o.98	o.91	-	-	-	-	-	-	2.57	-	-	1.75	-
ILE	-	-	o.89	o.92	o.87	o.97	-	-	2.11	-	-	-	-
LEU	1.oo	-	-	1.o5	-	1.o6	-	-	2.o8	1.95	1.o2	-	-
TYR	-	-	-	o.84	o.86	o.91	-	-	-	-	-	-	o.84
PHE	-	-	o.91	-	o.98	1.84	-	-	-	-	-	1.oo	-
LYS	1.o2	1.o9	1.2o	-	1.o2	1.o6	1.o1	1.oo	1.o3	1.oo	-	1.oo	-
HIS	-	-	-	o.99	-	2.9o	1.o2	-	o.98	o.94	-	-	-
ARG	-	-	-	1.oo	-	-	-	-	-	-	o.98	-	1.13
MET	-	-	-	-	1.o3	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	2

6.1o.2 ASP-PRO-Peptide

Das Peptid APpII wurde wie in Abschnitt 6.4.3 isoliert. Das Chromatogramm war identisch (siehe Abb. 15).

6.1o.2.1 Bruttoformel von STα APpII

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.1o.2 isolierten Peptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	2.o8	2	ILE	o.97	1
THR	1.91	2	LEU	7.24	6
SER	1.85	2	TYR	o.88	1
GLX	2.24	2	PHE	3.o1	3
PRO	2.9o	3	LYS	2.97	3
GLY	2.o1	2	HIS	2.86	3
ALA	6.87	7	ARG	o.89	1
VAL	4.91	6	CYS	1.47	2
Summe					47

6.1o.2.2 Sequenz von STα APpII

Das Peptid konnte wie schon in Abschnitt 6.7.3.2 vollständig sequenziert werden (Propinprogramm I). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10                  15
PRO-VAL-ASN-PHE-LYS-LEU-LEU-GLY-GLN-CYS-PHE-LEU-VAL-VAL-ALA-ALA-ILE-HIS-
95                    100                                 110

    20                  25                  30                  35
HIS-PRO-SER-ALA-LEU-THR-PRO-GLU-VAL-HIS-ALA-SER-LEU-ASP-LYS-PHE-LEU-CYS-
                        120                                         130

            40                  45
ALA-VAL-GLY-ALA-VAL-LEU-THR-ALA-LYS-TYR-ARG
                                    141
```

6.11 STRAUSS , β-KETTEN

6.11.1 Bromcyanpeptide

Die nativenKetten wurden gespalten und ohne anschließende Oxidation im Gegensatz zu früheren Experimenten über einen anderen Träger chromatographiert.

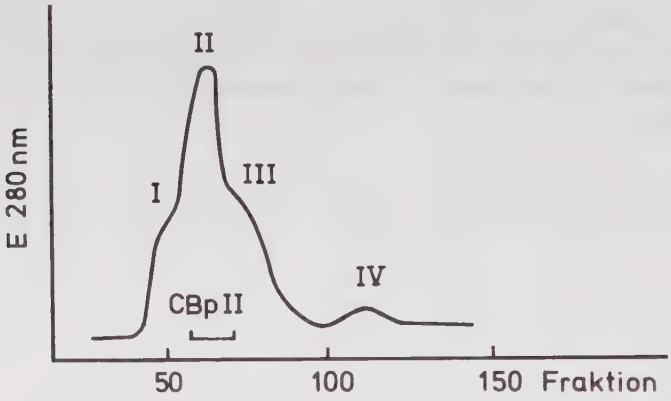


Abbildung 32

Gelchromatographische Trennung der Bromcyanpeptide (STβ). Bedingungen: Ansatz mit 1oomg β-Ketten; Sephadex G-5o med.; Säulendimension: 15o x 2.5cm; mobile Phase: 1o%-ige Ameisensäure in 8mHarnstoff; Durchfluß 25ml/h; Fraktionsvolumen: 4ml.

Es wurde eine sehr schlechte Trennung erhalten. In der Gipfel-II-Fraktion wurde das Peptid CBpII vermutet. Trotz scharfen Schneidens wurden bei der Aminosäureanalyse keine guten Werte erhalten.

6.11.1.1 Sequenz von STβ CBpII

Der automatische Abbau (Quadrolprogramm) ergab ein stark verunreinigtes Peptid CBpII, sodaß die Sequenzanalyse nach 1o Schritten abgebrochen wurde. Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                  10
VAL-ARG-ALA-HIS-GLY-LYS-LYS-VAL-LEU-THR
60                                  69
```

6.11.2 Tryptische Peptide

Die nativen Ketten wurden in Spaltungspuffer suspendiert (da unlöslich) und unter Rühren gespalten. Das noch ungelöste Material wurde abzentrifugiert und verworfen. Wie bei den α-Ketten konnte auch hier kein "Core" ausgefällt werden. Da beim Einengen ein Teil der Peptide ausfiel, wurde etwas Guanidin.HCl zugegeben. Die nun klare Lösung wurde einer Gelfiltration unterworfen.

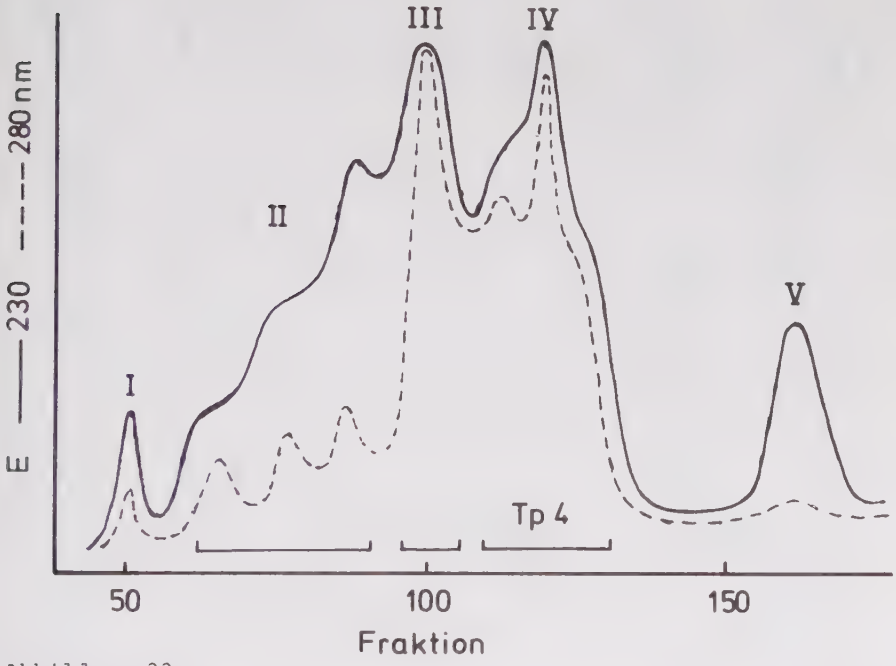


Abbildung 33

Gelchromatographische Trennung der tryptischen Peptide (STβ, löslicher Anteil).
Bedingungen wie in Abb. 12, Seite 29.

Es konnte nur Tp4 verunreinigt mit Guanidin.HCl isoliert werden.

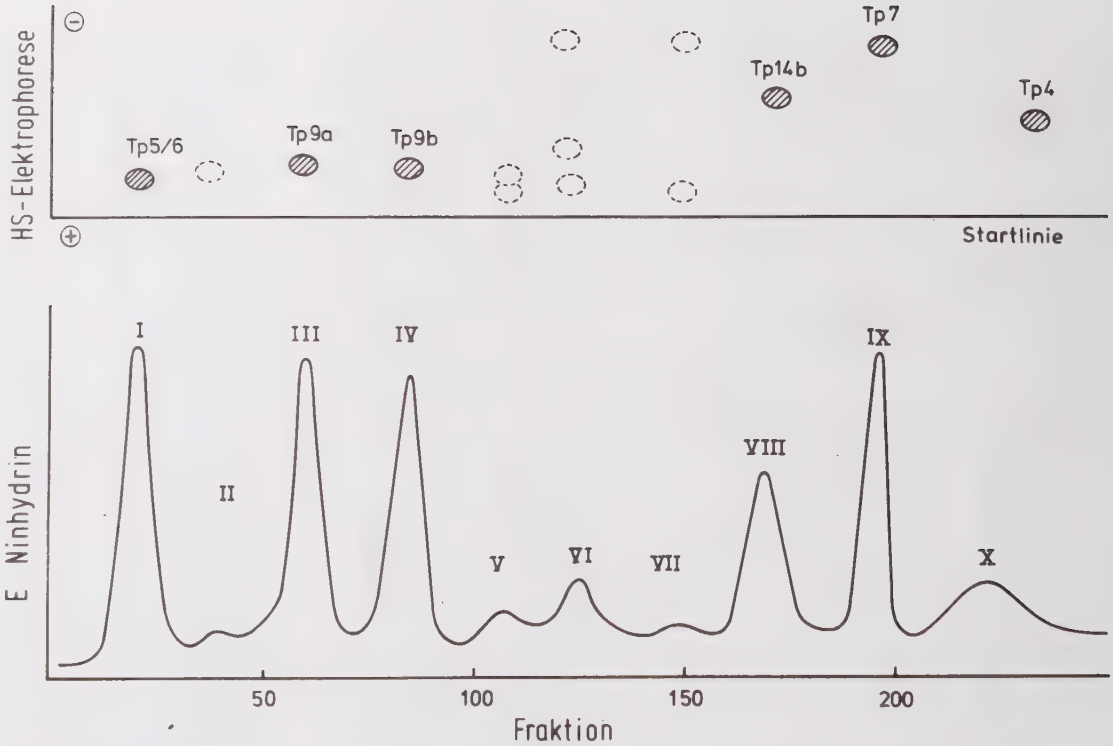


Abbildung 34

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide von STß (von Gipfel-II-Fraktion der Gelchromatographie Abb. 33). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht.Die Zuordnung erfolgte wie in Abb. 14, Seite 3o.
Bedingungen Austauschchromatographie und HS-Elektrophorese wie in Abb. 25, Seite 61.

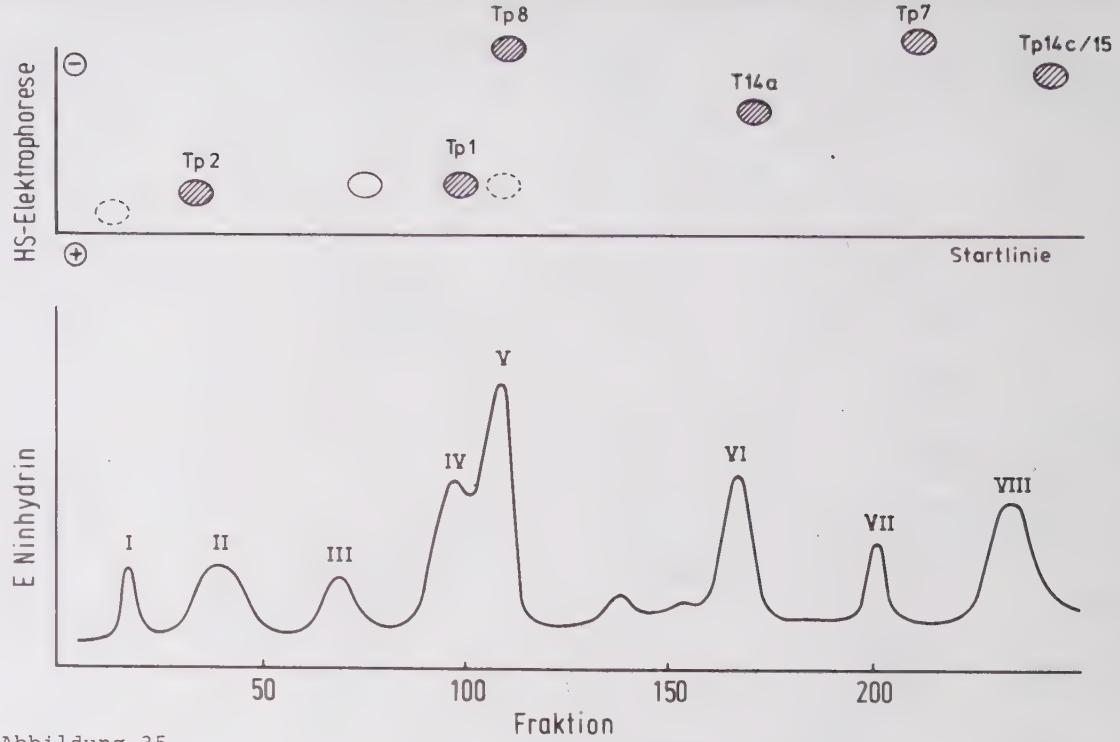


Abbildung 35

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide von STβ (von Gipfel-III-Fraktion der Gelchromatographie Abb. 33). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Die Zuordnung erfolgte wie im Abb.14, Seite 3o.
Bedingungen Austauschchromatographie und HS-Elektrophorese wie in Abb. 15, Seite 61.

6.11.2.1 Rechromatographie über Dowex 5o

Die Gipfelfraktionen II und III der Gelfiltration wurden einrotiert und getrennt untersucht. Aus der Gipfel-II-Fraktion konnten die Peptide Tp5/6, Tp9a, Tp9b, Tp14b, Tp7 und Tp4 (Abb. 34), und aus der Gipfel-III-Fraktion die Peptide Tp2, Tp1, Tp8, Tp14a, Tp14c/15 und nochmals Tp7 (Abb. 35) isoliert werden. Zur Vervollständigung der Sequenz wurden nur noch die Peptide Tp1o und Tp11 benötigt, die hier nicht gefunden wurden.

6.11.2.2 Die Isolierung von Peptid Tp1o/11

Um die Löslichkeit der Ketten zu erhöhen und somit die Spaltung zu erleichtern, wurden diese vorher oxidiert. Diesmal konnte in Lösung gespalten werden. Nach Ausfällung des "Core" wurde der lösliche Anteil wie vorher einer Gelfiltration unterzogen. Das Chromatogramm wurde in 1o Abschnitte unterteilt, die getrennt mit HS-Elektrophorese untersucht wurden (Abb. 36). In Abschnitt IV konnte das ditryptische Peptid Tp1o/11 nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden über Dowex 5o rechromatographiert. In Gipfel-III-Fraktion konnte hier das Peptid **Tp**1o/11 isoliert werden (Abb. 37).

6.11.2.3 Sequenz der tryptischen Peptide

Die Aminosäurefolge aller Peptide konnte vollständig bestimmt werden. Lysinpeptide wurden nach Umsetzung mit R IV im Quadrolprogramm, Arginylpeptide direkt im Propinprogramm II automatisch abgebaut (Bruttoformeln Tab. 8). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
                1                   5                  10
Tp4     :  LEU-LEU-ILE-VAL-TYR-PRO-TRP-THR-GLN-ARG
          31                                      40

                1                   5                  10
Tp14    :  PHE-PHE-ALA-SER-PHE-GLY-ASN-LEU-SER-SER-PRO-THR-ALA-ILE-
          41                                      50

          15                  20
           LEU-GLY-ASN-PRO-MET-VAL-ARG
                              61
```

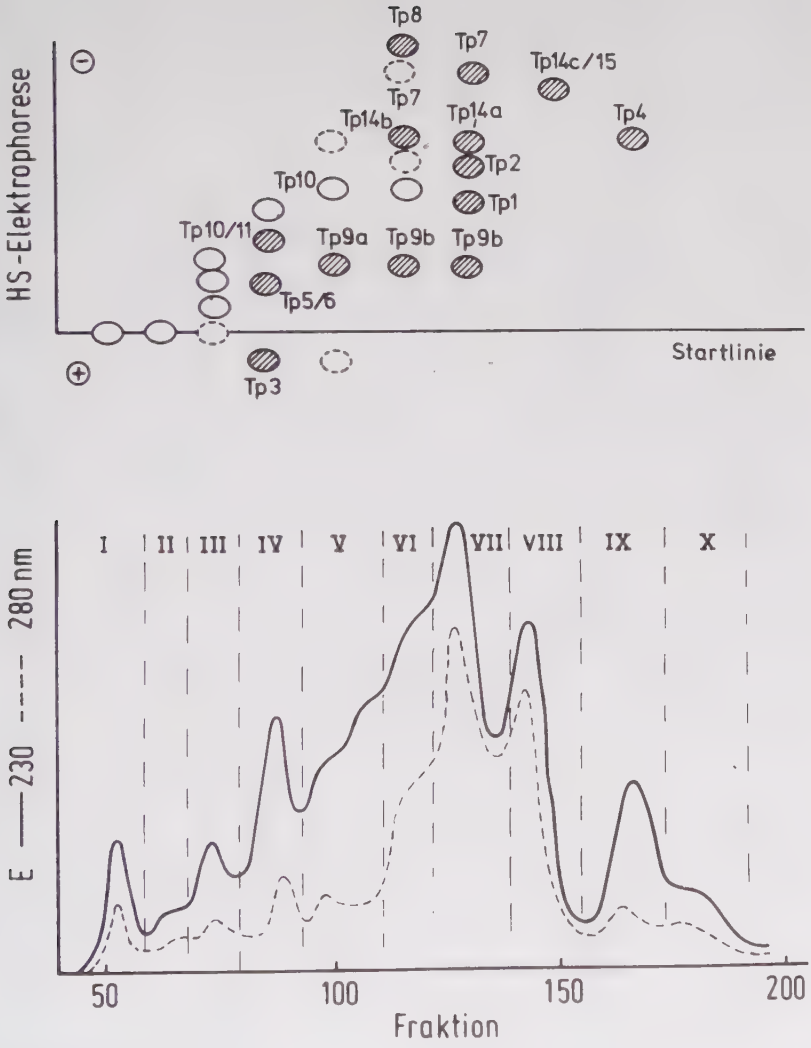


Abbildung 36

Gelchromatographische Trennung der löslichen tryptischen Peptide (STß). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht (Zuordnung wie in Abb. 18, Seite 42). In der Gipfel-IV-Fraktion konnte das gesuchte Peptid Tp1o/11 nachgewiesen werden.
Bedingungen Gelchromatographie und HS-Elektrophorese wie in Abb. 18, Seite 42 .

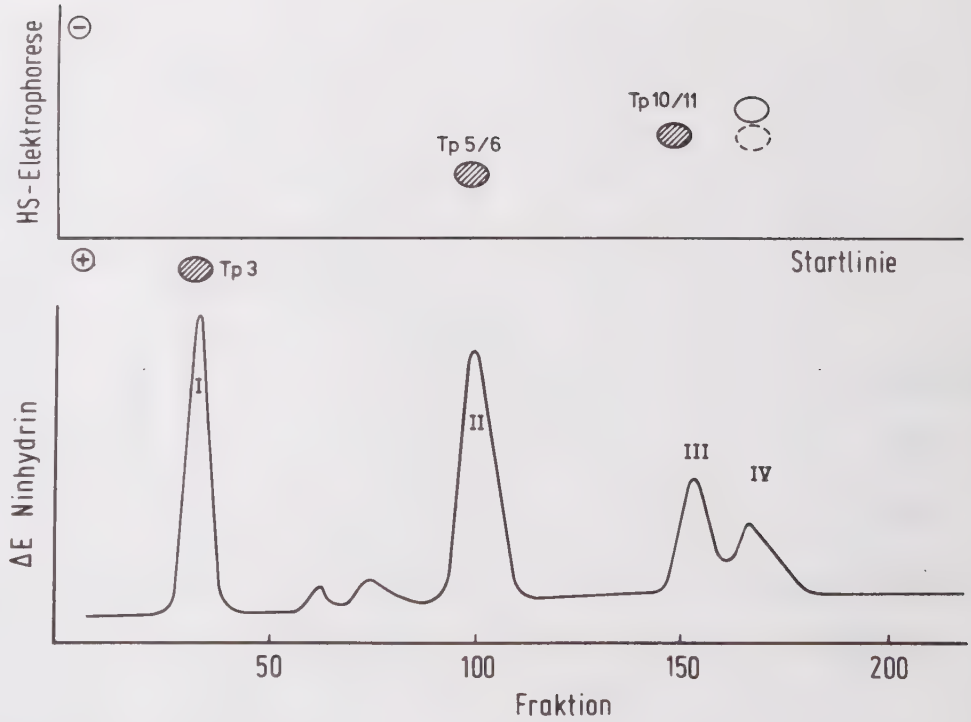


Abbildung 37

Rechromatographie über Dowex 5o der löslichen tryptischen Peptide von STß (von Gipfel-IV-Fraktion der Gelfiltration, Abb. 36). Die Gipfelfraktionen wurden mit HS-Elektrophorese auf die in ihnen enthaltenen Peptide untersucht. Die Zuordnung erfolgte wie in Abb.14, Seite 3o. In der Gipfel-III-Fraktion war das gesuchte Peptid Tp1o/11 enthalten.
Bedingungen Austauschchromatographie und HS-Elektrophorese wie in Abb.25, Seite 61.

Tabelle 3

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurden die Bruttoformeln der in Abschnitt 6.11.2 isolierten tryptischen Peptide von STß im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5/6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp1o/11	Tp14a	Tp14b	Tp14c/15
ASX	-	-	2.14	-	2.o3	-	-	1.23	3.12	3.88	-	-	-
THR	-	-	-	o.98	1.o1	-	-	1.o7	-	o.97	-	-	-
SER	1.oo	1.oo	-	-	2.81	-	-	o.85	-	o.94	-	-	-
GLX	3.23	1.83	1.1o	o.99	-	-	-	-	-	3.o4	-	-	-
PRO	-	-	-	o.86	1.96	-	-	-	-	o.86	-	-	-
GLY	-	1.98	1.o3	-	2.o7	1.o5	-	1.o4	-	-	-	-	-
ALA	1.o8	-	3.97	-	2.oo	1.o2	-	1.o8	-	1.o2	-	1.o1	-
VAL	1.14	-	1.94	o.74	1.o6	-	-	1.93	-	o.99	1.o2	1.23(2)	-
ILE	-	o.87	-	o.81	o.99	-	-	-	o.97	-	-	-	-
LEU	-	1.99	1.o2	2.16	2.o8	-	-	-	1.24	3.11	1.o1	1.o3	-
TYR	-	-	-	o.94	-	-	-	-	-	-	-	-	o.74
PHE	-	-	-	-	2.74	-	-	o.98	-	2.o4	-	-	-
LYS	1.oo	1.oo	-	-	-	1.o1	1.oo	o.97	1.23	1.o1	-	-	1.o4
HIS	-	-	-	-	-	1.oo	-	-	-	2.o3	-	1.o1	1.o1
ARG	-	-	o.98	1.o2	1.o1	-	-	-	-	o.98	o.97	o.99	-
MET	-	-	-	-	1.o1	-	-	-	-	-	-	-	-
TRP	1.oo	-	-	1.oo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	o.86	-	-	-	-	-	-	o.91	-	-	-
Summe	8	9	13	1o	21	4	1	1o	6	22	3	8	3

```
                1
Tp7       : ALA-HIS-GLY-LYS-
            62          65

                1               5                   10
Tp9a      : VAL-LEU-THR-SER-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-LYS
            67          70                  76

                1               5
Tp9b      : ASN-LEU-ASP-ASN-ILE-LYS
            77          80      82

                1               5                   10
Tp1o/11   : ASN-THR-PHE-ALA-GLN-LEU-SER-GLU-LEU-HIS-CYS-ASP-LYS-LEU-
            83                          90

                15                  20
            HIS-VAL-ASP-PRO-GLU-ASN-PHE-ARG
                        100             104

                1
Tp14a     : LEU-VAL-ARG
            133     135

                1               5
Tp14b     : VAL-VAL-ALA-HIS-ALA-LEU-ALA-ARG
            136             140         143

                1
Tp14c/15: LYS-TYR-HIS
            144     146
```

6.11.3 ASP-PRO-Peptide

Es wurde versucht, wie bei den α-Ketten den "Core"-Bereich über das Peptid APpII aufzuklären. Die Spaltung wurde mit nativen Ketten durchgeführt. Die Trennung auf Sephadex ergab auch hier ein ähnliches Bild (Abb. 38).

In Gipfel-II-Fraktion wurde das Peptid APpII nachgewiesen. Es konnte vollständig im Sequenator abgebaut werden.

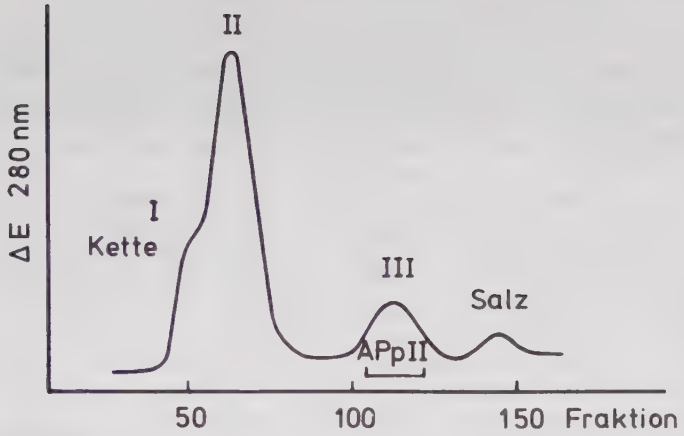


Abbildung 38

Gelchromatographische Trennung der Peptide nach hydrolytischer Spaltung der ASP-PRO-Bindung von STß.
Bedingungen wie in Abb. 15, Seite 35.

6.11.3.1 Sequenz von STß APpII

Das Peptid konnte wie in Abschnitt 6.7.3.2 vollständig sequenziert werden (Propinprogramm I). Die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren ist:

```
1                5                   10                  15
PRO-GLU-ASN-PHE-ARG-LEU-LEU-GLY-ASP-ILE-LEU-ILE-ILE-VAL-LEU-ALA-ALA-HIS-
100                                          110

     20                  25                  30                  35
-PHE-THR-LYS-GLU-PHE-THR-PRO-GLU-CYS-GLN-ALA-ALA-TRP-GLN-LYS-LEU-VAL-ARG-
         120                                         130

              40                  45
-VAL-VAL-ALA-HIS-ALA-LEU-ALA-ARG-LYS-TYR-HIS
                   140                 146
```

6.11.3.2 Bruttoformel von STß APpII

Nach Hydrolyse (in 6n HCl, 2oh bei 11o°C) wurde die Bruttoformel des in Abschnitt 6.11.3 isolierten Peptids im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäureanalyse liefert folgendes Ergebnis:

	gef.	Sequenz		gef.	Sequenz
ASX	2.34	2	LEU	5.93	6
THR	2.1o	2	TYR	o.62	1
GLX	4.87	5	PHE	3.o1	3
PRO	2.13	2	LYS	3.o2	3
GLY	1.14	1	HIS	2.96	3
ALA	6.54	7	ARG	2.93	3
VAL	3.1o	4	CYS	o.74	1
ILE	2.24	3	TRP	-	1
Summe					47

6.12. Zusammenfassung, Strauß

α- Ketten

Zwei Spaltungsmethoden waren ausreichend, die Primärstruktur aufzuklären (tryptische und ASP-PRO-Spaltung). Durch einen besonders flachen Gradienten konnten über Dowex 5o fast alle Peptide isoliert werden.

ß- Ketten

Als brauchbare Alternative zum Arginyl-Peptid Ap5 zur Aufklärung des "Core"-Bereichs erwies sich das ASP-PRO-Peptid APpII. Das Peptid Tp1o/11 konnte ohne Oxidation nicht isoliert werden. Die restlichen tryptischen Peptide konnten besser getrennt werden, wenn von den nativen Ketten ausgegangen wurde.

6.12.1 Übersicht der Sequenzanalyse von ST α/β

Es wird angegeben, wieviel Reste vom N-Terminus der jeweiligen Kette (aus Abschnitt 5.3.2) oder Peptide der α- und β-Ketten (aus Abschnitt 6.1o und 6.11) im Sequenator abgebaut und in welcher Zusammenstellung der Ergebnisse die Primärstrukturen der α- und β-Ketten erhalten wurden (siehe auch Abschnitt 7.1).

Sequenzanalyse der Kettenabschnitte die ausreichen, die Primärstruktur darzustellen			Bestätigung der Primärstruktur durch zusätzlich analysierte Peptide		
abgebaute Reste	Peptid, Protein	Zahl der Reste	abgebaute Reste	Peptid	Zahl der Reste
α - Ketten					
1 - 4o	Ketten	141	32 - 4o	Tp5	9
41 - 56	Tp6	16			
57 - 6o	Tp7	4			
61	Tp8	1			
62 - 82	Tp9a	21			
83 - 9o	Tp9b	8			
91 - 92	Tp1o	2			
93 - 99	Tp11	7			
95 - 141	APp11	47	14o - 141	Tp14	2
β - Ketten					
1 - 4o	Ketten	146			
41 - 61	Tp5/6	21			
6o - 7o	CBp11	87	62 - 65	Tp7	4
67 - 76	Tp9a	1o			
77 - 82	Tp9b	6			
83 - 1o4	Tp1o/11	22			
1oo - 146	APp11	47	133 - 135	Tp14a	3
			136 - 143	Tp14b	8
			144 - 146	Tp14c/15	3

7. TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER VOLLSTÄNDIGEN PRIMÄRSTRUKTUREN DER HIER ERARBEITETEN VOGELHÄMOGLOBINE UND IHRE UNTERSCHIEDE

7.1 PRIMÄRSTRUKTUREN

In den Abbildungen 39-44 wird die Konstitution der α- und β- Ketten der Hämoglobine von Graugans, Streifengans und Strauß wiedergegeben. Die helicalen Bereiche A - H und die interhelicalen Bereiche der Peptidketten (AB, EF usw.) sind eingetragen. Austausche bei homologem Vergleich identischer Ketten anderer Vögel sind über den Sequenzen eingetragen.

7.2 UNTERSCHIEDE IN DER PRIMÄRSTRUKTUR, POSITION UND FUNKTION DER AUSGETAUSCHTEN RESTE

In den Tabelle 9 - 1o wird die Position, Mutation (Einpunkt-, Zweipunkt-Mutation) und spezielle Funktion der Austausche angegeben.

Abbildung 39

Primärstruktur von Graugans, α-Ketten (Huhn),

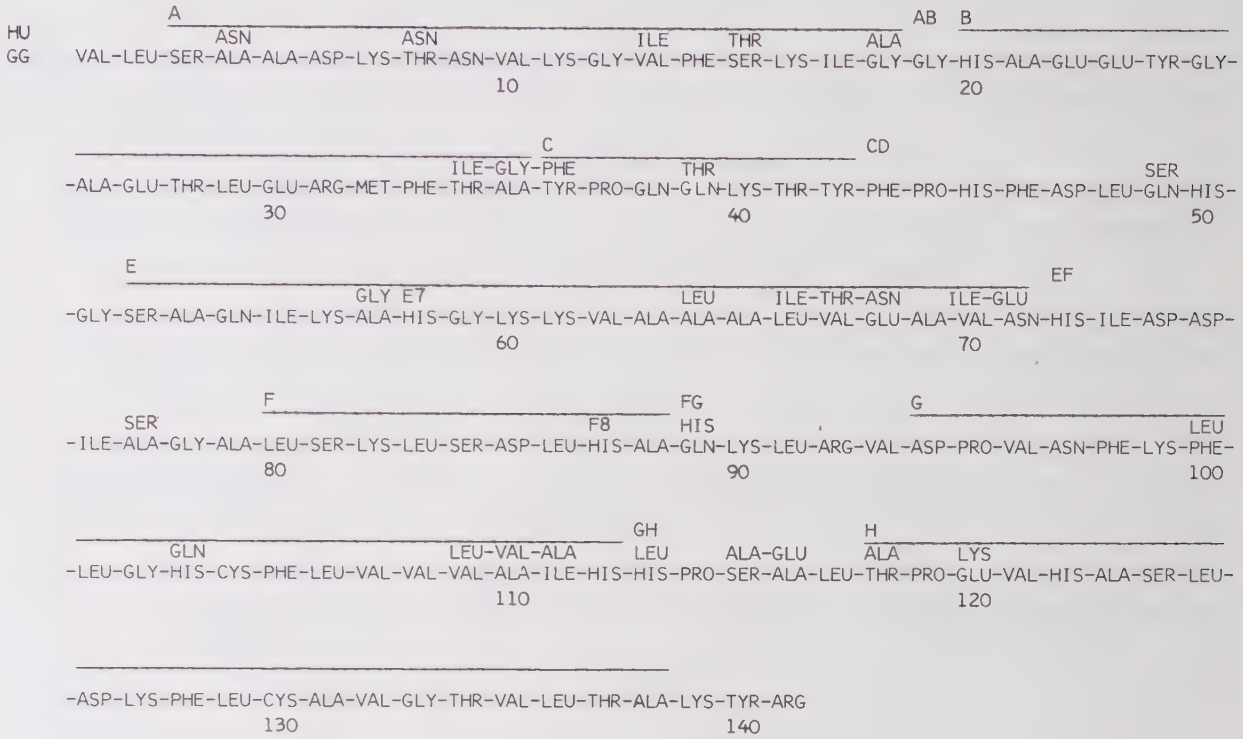


Abbildung 4o

Primärstruktur von Graugans (Huhn), β-Ketten.

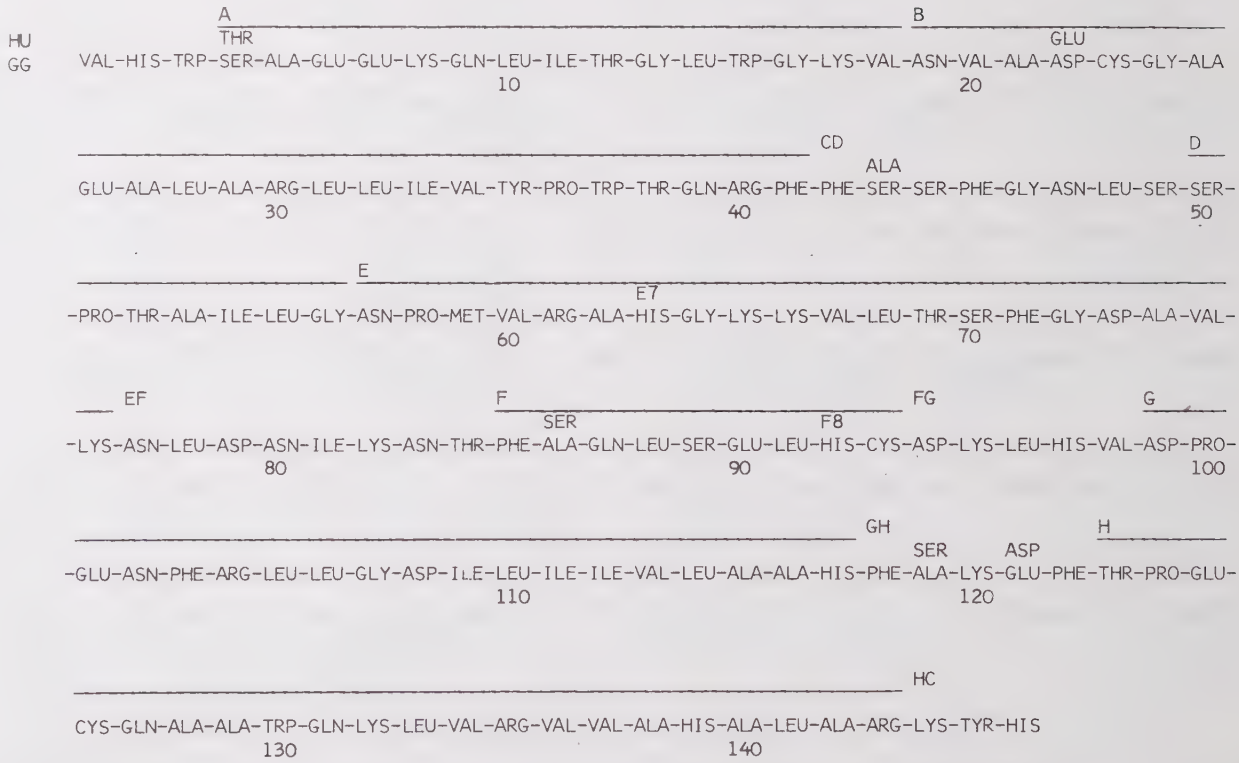


Abbildung 41

Primärstruktur von Streifengans (Graugans), α-Ketten.

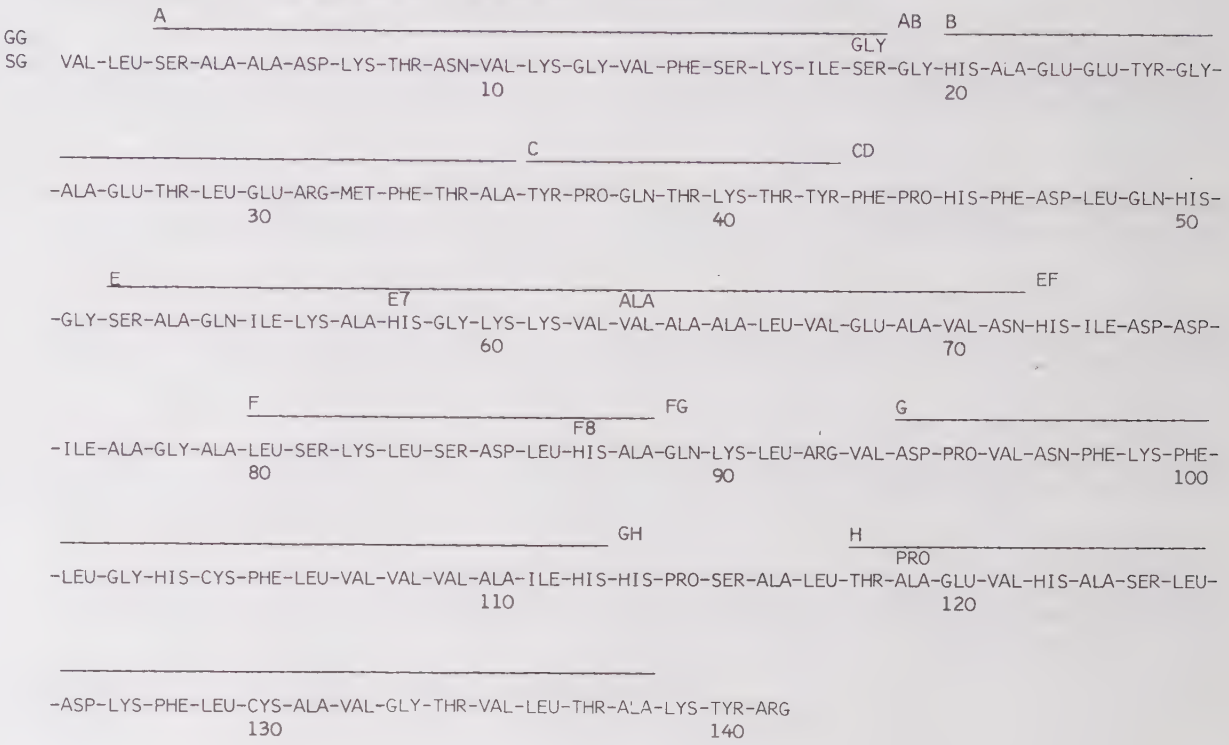


Abbildung 42

Primärstruktur von Streifengans (Graugans), β-Ketten.

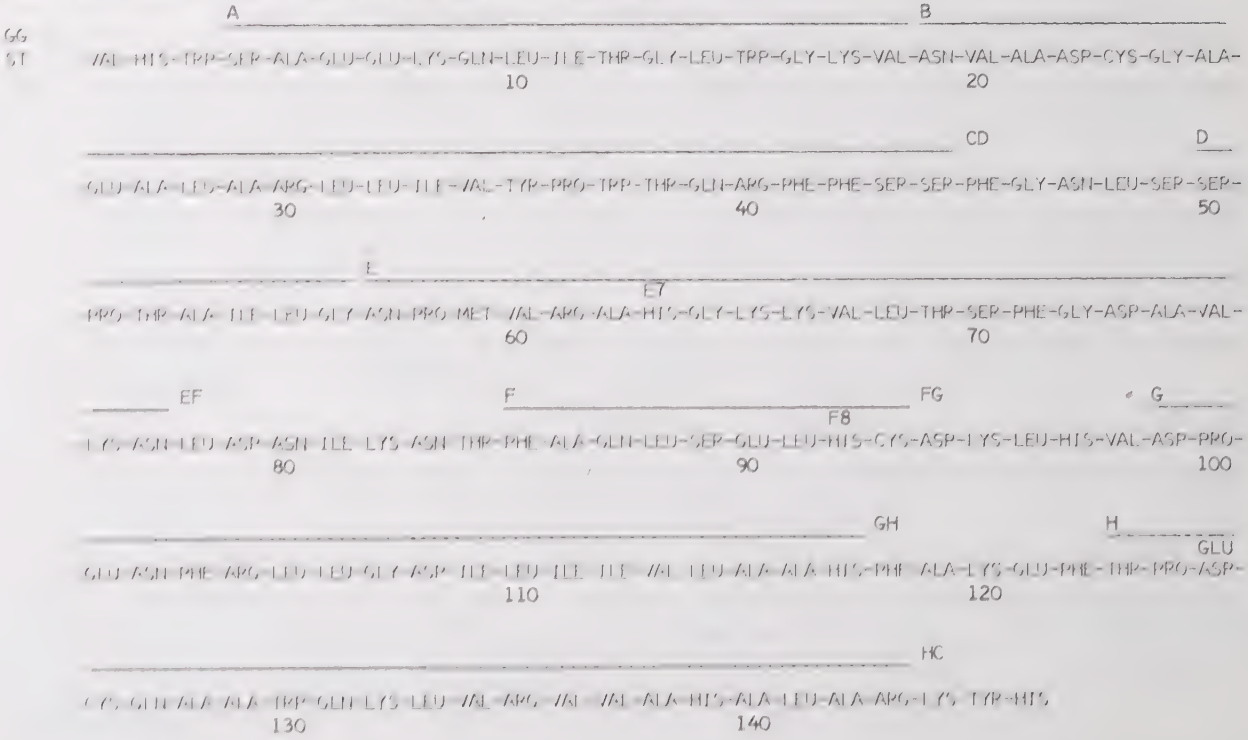


Abbildung 43

Primärstruktur von Strauß (Graugans), α-Ketten.

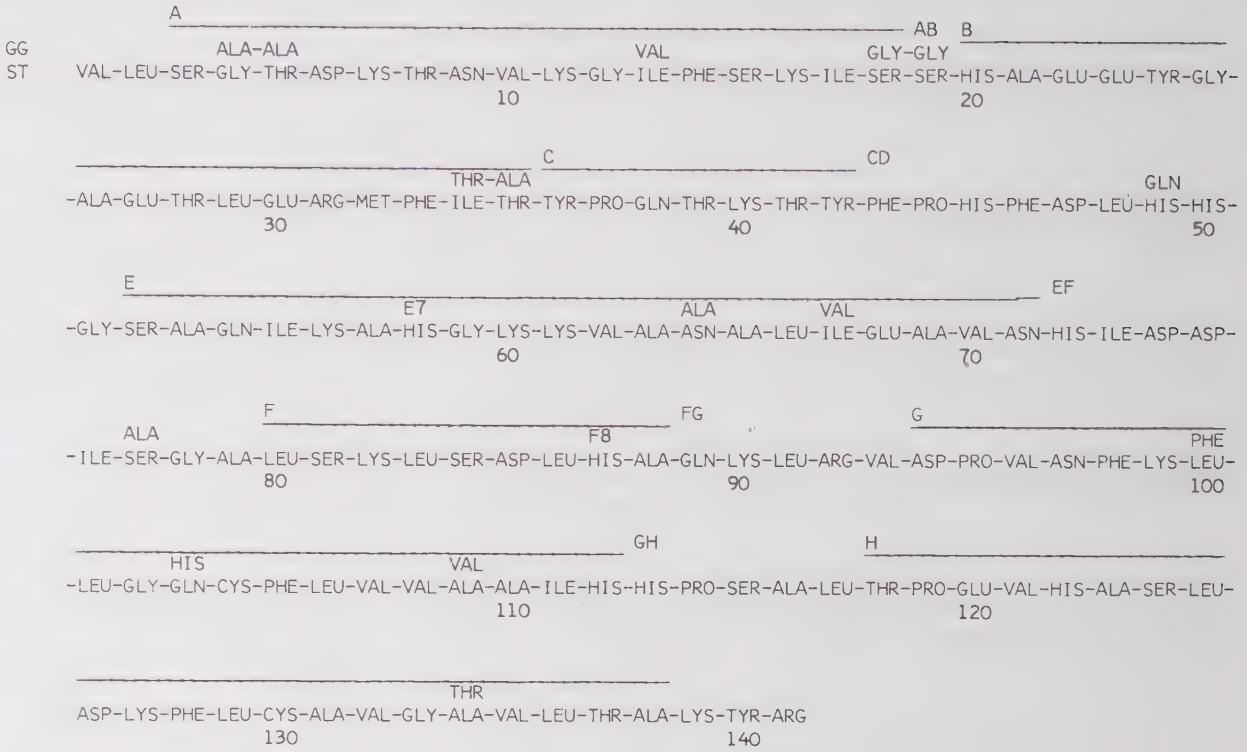
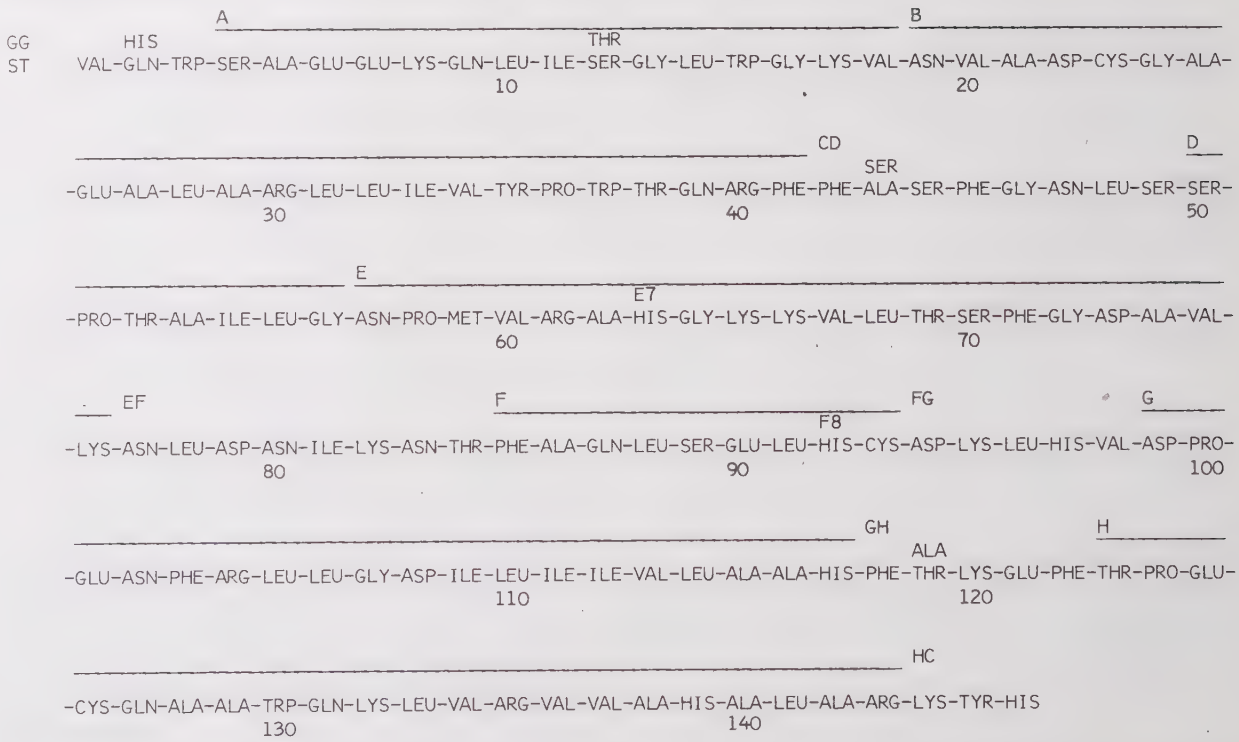


Abbildung 44

Primärstruktur von Strauß (Graugans), ß-Ketten.



Unterschiede in der Primärstruktur Graugans - Strauß

	Helix	Interhelikal	Kettenposition	Aminosäure Austausch GG → ST	Nucleotid Mutation	Funktion der Aminosäure
α-Ketten	A 2	-	4	ALA → GLY	1	
	A 3	-	5	ALA → THR	1	
	A 11	-	13	VAL → ILE	1	
	A 16	-	18	GLY → SER	1	
	-	AB	19	GLY → SER	1	
	B 15	-	34	THR → ILE	1	$\alpha_1\beta_1$-Kontakt
	B 16	-	35	ALA → THR	1	$\alpha_1\beta_1$-Kontakt
	-	CD7	49	GLN → HIS	1	
	E 13	-	64	ALA → ASN	2	
	E 16	-	67	VAL → ILE	1	
	-	EF6	77	ALA → SER	1	
	G 7	-	1oo	PHE → LEU	1	
	G 1o	-	1o3	HIS → GLN	1	$\alpha_1\beta_1$-Kontakt
	G 16	-	1o9	VAL → ALA	1	
	H 17	-	134	THR → ALA	1	
Summe	12	3	-	15	16	3
β-Ketten	-	NA2	2	HIS → GLN	1	Phosphat-Bindungsstelle
	A 9	-	12	THR → SER	1	
	-	CD2	43	SER → ALA	1	
	-	GH2	119	ALA → THR	1	$\alpha_1\beta_1$-Kontakt
Summe	1	3	-	4	4	2

Tabelle 1o

Unterschiede Graugans - Streifengans

	Helix	Interhelikal	Kettenposition	Aminosäure Austausch GG → SG	Nucleotid Mutation	Funktion der Aminosäure
α-Ketten	A 16	-	18	GLY → SER	1	
	E 12	-	63	ALA → VAL	1	$\alpha_1\alpha_1$-Kontakt
	H 2	-	119	PRO → ALA	1	$\alpha_1\beta_1$-Kontakt
Summe	3	o	-	3	3	2
β-Ketten	H 3	-	125	GLU → ASP	1	$\beta_1\alpha_1$-Kontakt
Summe	1	o	-	1	1	1

Unterschiede Strauß - Streifengans (es sind nur zusätzliche Unterschiede zu Graugans-Strauß (Tab9) aufgeführt),

α-Ketten	A 16		-	entfällt	- 1	-
	E 12		63	ALA → VAL	1	$\alpha_1\alpha_1$ -Kontakt
	H 2	-	119	PRO → ALA	1	$\alpha_1\beta_1$ -Kontakt
Übertrag aus T.8	12	3	-	15	16	3
Summe	13	3	-	16	17	5
β-Ketten	H 3	-	125	GLU → ASP	1	$\beta_1\alpha_1$ -Kontakt
Übertrag aus T.8	1	3	-	4	4	2
Summe	2	3	-	5	5	3

8. DISKUSSION

8.1 HOMOLOGER VERGLEICH DER PRIMÄRSTRUKTUREN

Die α-Ketten der untersuchten Vögel werden von 141 Aminosäuren, die β-Ketten von 146 Aminosäuren aufgebaut.

8.1.1 Graugans-Streifengans

Es wurden in den β-Ketten ein, in den α-Ketten drei Unterschiede gefunden (Tabelle1o). Nach der Theorie der minimalen Basenaustausche [29] sind alle Unterschiede durch Einpunktmutationen zu erklären. Alle Austausche sind neutral. In α119 und β125 werden Reste ersetzt, die wichtig für die Stabilisierung der Quartärstruktur [3o] sind (α1β1-Kontakte). Der Austausch an der sehr invarianten Stelle α119 (H3) sollte weiterhin Auswirkungen auf die Tertiärstruktur haben. Der Ersatz von α63 (E12) VAL bewirkt eine drastische Veränderung der Tertiärstruktur. Die längere Seitenkette des Valins wird durch die Seitenkette α21 (B2) ALA gestört. Die E-Helix muß sich durch diese sterische Hinderung um fast 1,57 Angström verschieben [31].

8.1.2 Strauß-Gänse

Die α-Ketten unterscheiden sich in 15(GG) bzw. 16(SG), die β-Ketten in 4(GG) bzw. 5(SG) Aminosäuren (Tabelle 9-1o). In α64 (E13) ASN liegt eine Zweipunktmutation vor, während alle übrigen Austausche von Einpunktmutationen abgeleitet werden können. Die Austausche in den α-Ketten sind insgesamt

neutral, da α49 (CD7) HIS durch α103 (Glo) GLN wieder aufgehoben wird. Die β-Ketten des Straußes sind saurer durch β2 (NA2) GLN. In dieser Position ist eine der12 Phosphatbindungsstellen [32] von einer Mutation betroffen. In α34 (B15) ILE, α35 (B16) THR, α103 (Glo) GLN und β119 (GH2) THR sind α1β1-Kontaktstellen verändert. In den α-Ketten werden 3/4 der Unterschiede in helicalen Bereichen gefunden, davon 1/4 in der A-Helix. In den β-Ketten überwiegen Austausche in den interhelicalen Bereichen.

8.1.3 Vergleich mit anderen Hämoglobinen

Es sind wenig Primärstrukturen von Vogelhämoglobinen bekannt. Dazu gehören die Haupt- und Nebenkomponenten des Hühnerhämoglobins[27,33]. Kurz vor Abschluß dieser Untersuchungen, wurde mir eine Arbeit über die α-Ketten der Graugans bekannt [34].

8.1.3.1 "Belgische" Graugans α-Ketten

Die Kettensequenz enthält eingeklammerte Bereiche und gibt nur ASX und GLX an. Sie unterscheidet sich von der hier erarbeiteten in 28 Resten. Es wurden nur tryptische Peptide verwendet (Isolierung mit Dowex 50 und HS-Elektrophorese). Die Peptide wurden N-terminal nach EDMAN (Handmethode) abgebaut und mit Dansylclorid identifiziert. C-terminal wurden bis zu 6 Aminosäuren mit Carboxypeptidase A und B abgespalten und im Analysator nachgewiesen. Die Sequenz wurde mit homologer Zuordnung zu α-Ketten des Huhnes erstellt. Bei kritischer Betrachtung der experimentellen Daten dieser Arbeit, kann man viele Fehler und schlechte Methodik feststellen. Fast die Hälfte der Unterschiede liegt im "Core"-Bereich. Schon die ungenügende Qualität der Kettentrennung läßt kaum sauberes Arbeiten erwarten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzdaten hingegen sind mit verschiedenen Spaltungsmethoden und Überlappungspeptiden mehrfach und eindeutig belegt.

8.1.3.2 Hauptkomponenten vom Huhn(AI und AII)
Im Blut der Hühner findet man eine Hauptkomponente AII mit ca. 6o % (im Gegensatz zu den Gänsen mit ca. 9o - 95 %) und je eine Minorkomponente mit 3o % (AI) und 1o % (AIII) [35]. Die Primärstrukturen von AI und AII wurden von MATSUDA et. al. [27,33] aufgeklärt. Die beiden Komponenten unterscheiden sich nur in den α-Ketten, die β-Ketten sind identisch.

Beim Vergleich von z.B. Graugans-α-Ketten mit Huhn-AII-α-Ketten werden 3o, mit Huhn AI-α-Ketten weit über 6o Unterschiede gefunden. Diese größere Homologie der α-Ketten der Graugans mit Huhn AII lassen darauf schließen, daß die entsprechenden α-Ketten verglichen wurden.

Tabelle 11
Zahl der Austausche bei homologem Vergleich der α- und β-Ketten der hier bearbeiteten Vogelhämoglobine mit den Ketten der Hauptkomponente AII vom Huhn [25,29]

	α-Ketten		β-Ketten	
	Aminosäure	Nucleotid	Aminosäure	Nucleotid
Huhn - GG	3o	39	6	6
SG	32	41	7	7
ST	28	38	7	7

Gehäuft findet man Austausche in den α-Ketten am Anfang der A-Helix, Ende der E-Helix und Ende der G-Helix bis Anfang der H-Helix ("Core"-Bereich).

Es fällt auf, daß bei Gänsen und Strauß identische Reste beim Huhn mutiert sind. Weiterhin verwundert, daß im "Core"-Bereich der α-Ketten bei allen hier bearbeiteten Vögeln eine ganz spezifische Vogelsequenz gefunden wurde, die stark von der des Huhnes abweicht.
Diese Abweichungen und Besonderheiten in den Verwandtschaftsbeziehungen aufgrund genetischer Distanzen (über die später noch berichtet wird) lassen vermuten, daß die großen Unterschiede in der Primärstruktur des Hühnerglobins nicht biologisch bedingt sind, sondern eher auf einer fehlerhaften Sequenzanalyse beruhen könnten. Diese Vermutungen sind kürzlich in unserer Arbeitsgruppe bestärkt worden, in der auch das Hämoglobin des Fasans bearbeitet wird. Huhn und Fasan sind sehr nah verwandt, so daß keine großen Unterschiede erwartet werden. Der "Core"-Bereich der α-Ketten ist vollständig aufgeklärt. Er ist bis auf einen Rest mit in dieser Arbeit beschriebenen Vogelsequenz in diesem Bereich identisch und weicht stark von der Huhnsequenz ab. Vermutlich ist auch die Primärstruktur der ß-Ketten fehlerhaft. Hier würden nur geringfügige Abweichungen erwartet werden.
Die Sequenzanalyse des Hühnerhämoglobins wurde vor 9-1o Jahren durchgeführt. Beim damals noch überwiegend manuellen Abbau und der unausgereiften Methodik wären Fehler in der Sequenz denkbar.

8.1.3.3 Vögel - Mensch

Die hier untersuchten Vogelhämoglobinprimärstrukturen unterscheiden sich von denen des Menschen in den α- und β-Ketten um jeweils über 4o Aminosäuren. Die Huhn-α-Kettensequenz weicht dagegen nur um 35 Aminosäuren ab. Bei Übertragung der Aminosäureaustausche in Nucleotidaustausche [29] ist der Unterschied noc deutlicher zu erkennen. Gegenüber 53-57 Mutationen bei Graugans-, Streifengans- und Strauß-α-Ketten, findet man beim Huhn nur 41 Unterschiede (Tab. 12). Wird die in der Literatur beschriebene Primärstruktur des Hühnerhämoglobins nach den hier erarbeiteten Ergebnissen korrigiert, kann eine gute Übereinstimmung erreicht werden.

Tabelle 12

Zahl der Austausche beim homologen Vergleich der α- und β-Ketten des menschlichen Hämoglobins mit den Ketten der Vogelhämoglobine [25,29]

	α-Ketten		β-Ketten	
	Aminosäure	Nucleotid	Aminosäure	Nucleotid
Mensch - GG	41	53	44	59
SG	44	56	44	59
ST	43	57	46	60
HU	35	41	45	59

In den β-Ketten der Vögel sind zwei saure Reste durch neutrale Aminosäuren ersetzt. Dies kann für die größere Basizität der Vögelhämoglobine verantwortlich sein. Es fällt auf, daß im N-terminalen Bereich bis β7o eine Reihe von polaren Resten (überwiegend saure) von neutralen ersetzt werden, während im C-terminalen Bereich bis β12o dafür entsprechend viele neutrale Aminosäuren durch polare Reste ausgetauscht sind.

In den β-Ketten findet man bei 5/6 der Unterschiede zum Menschen bei allen Vögeln identische Aminosäuren, in den α-Ketten bei 2/3 der Unterschiede. Diese Aminosäuren werden zu einem großen Teil nur bei den Vögeln in diesen Positionen gefunden. Dies deutet auf eine spezifische Vogelsequenz hin. Außerdem traten Mutationen innerhalb der Vögel überwiegend an identischen Stellen auf. Das heißt, Vogelhämoglobine können nur an ganz bestimmten Kettenpositionen mutieren, die stark beschränkt sind.

8.2 EVOLUTION, SYSTEMATIK UND MOLEKULARBIOLOGIE

Die Kenntnisse über Verwandtschaft und Evolution der Lebewesen beruhten bis vor kurzem auf Daten der vergleichenden

Anatomie, Entwicklungsgeschichte, Verhaltensforschung usw. in Kombination mit Daten der Paläontologie .

Mit Entwicklung der Biochemie und somit auch der Molekularbiologie sind die Konstitution und Struktur vieler biologischer Moleküle verschiedenster Funktion und Spezies aufgeklärt worden. Beim Vergleich homologer Moleküle [37] verschiedener Tiere, konnte ein Zusammenhang zwischen Verwandtschaftsgrad und Unterschied der betreffenden Moleküle hergestellt werden. Aussagen wurden erhalten durch Vergleich der Primär-, Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur von RNA, DNA und Proteinen, immunologischer Reaktionen [36]usw. Die Kombination dieser Erkenntnisse mit Daten aus der Paläontologie hat eine neue Wissenschaftsrichtung begründet, die Paläobiologie oder besser Paläogenetik [38]. Hier wird davon ausgegangen, daß sich alles Leben aus einem oder wenigen Urgenen [39 - 42] durch verschiedene Mechanismen entwickelt hat. Beim Vergleich homologer Primärstrukturen von Proteinen werden unterschiedliche Austauschraten [43] gefunden. So zeigen z.B. Fibrinpeptide eine hohe Zahl von Änderungen in der Sequenz gegenüber Cytochromen oder Histonen.

8.2.1 Hämoglobin in der Paläogenetik

Die Hämoglobine haben sich als nützlich für die Paläogenetik erwiesen. Die Austauschraten der Hämoglobine bewegen sich in der Mitte anderer Proteine: Außerdem liegen zwei Ketten vor, die sich in ihrer Mutationsrate kaum unterscheiden. Gewöhnlich findet man in den β-Ketten eine geringfügig höhere Austauschrate [44].

Stammbäume werden mit Hilfe des paarweisen Vergleiches aufgestellt [29], wobei die Anzahl der Aminosäurenaustausche [45] oder besser der minimalen Basenaustausche [29] verwendet werden. Mit Hilfe verschiedener mathematischer Operationen [46,47] lassen sich die genetischen Distanzen und der gemeinsame Vorfahre mehrerer Spezies berechnen.

8.2.2 Zur Evolution der Vögel

Im Verhältnis zu anderen Tieren sind wenige Fossilien von Vögeln bekannt. Das älteste Dokument sind Versteinerungen des Archaeopteryx Litographica aus einer Zeit vor ca. 15o Millionen Jahren (oberes Jura). Aus der unteren bis mittleren Kreidezeit (vor 12oMill.Jahren) soll ein Fossil eines Vogels zur Gattung Anseres gehörend [48] entdeckt worden sein. aus der Zeit vor 12o - 6o Mill. Jahren werden Reste von spezialisierten Tauch- und Schwimmvögeln gefunden. Ab 6o Mill. Jahren mehren sich Vogelfossilien auch heute noch existierender Vogelfamilien. So läßt sich aus Eierschalen und Knochenresten rekonstruieren, daß die Strauße als kleine Laufvögel im Eozän (4o - 5o Mill.) [49] in den Steppengebieten Asiens evolvierten. Der gemeinsame Vorfahre der Vögel wird nach verschiedenen Quellen im großen Zeitraum von 9o - 15o Mill. Jahren vermutet. In dieser Zeit soll die Auftrennung in die Ordnungen und Familien erfolgt sein. Dies sind nur unbelegte Hypothesen, denn nach einigen Daten könnte die Trennung ebensogut in neuerer Zeit zwischen 5o und 9o Mill. Jahren stattgefunden haben. GOODMAN et.al. [49]gingen bei Stammbäumen nach Sequenzdaten des Cytochrom c von 9o Mill. Jahren für den gemeinsamen Vorfahren der Vögel aus.

Der Strauß nimmt eine besondere Stellung im Stammbaum der Vögel ein. Er wurde als lebendes Fossil, als "Urvogel" gesehen. Er wird als Bindeglied zwischen Vögeln und Reptilien dargestellt. In neuerer Zeit setzt sich die Theorie immer mehr durch, daß sich die straußenähnlichen Vögel erst in späterer Zeit aus zunächst flugfähigen, nicht näher klassifizierten, Vögeln zurückgebildet haben sollen.

Der gemeinsame Vorfahre von Streifengans und Graugans wird der Zeit vor Entstehung des Himalaya (vor ca. 35 Mill. Jahren) zugeordnet [5o]. Dem widerspricht die Vogelsystematik, wel-

che die Streifengans nicht mehr als eigene Gattung führt[51].

8.3 AUSSAGEN ZUR EVOLUTION DER VOGELHÄMOGLOBINE ANHAND EIGENER SEQUENZDATEN

Um umfassende Aussagen machen zu können, sind mehr als die hier erarbeiteten Sequenzdaten nötig. Widersprüchliche und ungenaue Ergebnisse der Paläontologie erschweren die Analyse.

8.3.1 Ungleiche Evolution der α- und β-Ketten

Beim homologen Vergleich fällt die signifikant unterschiedliche Mutationsrate der α- und β-Ketten auf. Dies ist ganz ungewöhnlich und in dieser Form noch nie beschrieben. Das heißt, die Selektion war bei den Untereinheiten eines Proteins trotz homologer Sequenz, fast identischer Tertiärstruktur und ähnlicher Funktion um den Faktor 3-4 verschieden.

In Tabelle 13 wird das Verhältnis der Mutation der α- und β-Ketten dargestellt (homologer Vergleich). Beim Vergleich der hier erarbeiteten Sequenzen findet man in den α-Ketten 3-4 mal mehr (oder in den β-Ketten 3-4 mal weniger) Austausche. Da wenig Zweipunktmutationen stattgefunden haben, ist der Unterschied zwischen Aminosäure- und Nucleotidaustausch gering. Beim Huhn werden dagegen Werte von 4-5 (Aminosäuren) und 5.4 - 6.5 (Nucleotide) gefunden. Dieser größere Unterschied in den Mutationsraten der α-und β-Ketten und die größere Differenz zwischen Nucleotid und Aminosäureaustausch ist wahrscheinlich auf Fehler der Primärstruktur des Hühnerhämoglobins zurückzuführen (die auch in vorigen Kapiteln postuliert wurden).

Tabelle 13

Der Faktor α/β gibt an, um wieviel mal mehr (oder weniger) die α-Ketten im Verhältnis zu den β-Ketten mutiert sind, beim homologen Vergleich der Hämoglobine untereinander. Der Faktor α/βwird sowohl für Aminosäuremutationen, als auch nach Übertragung dieser in Nucleotidmutationen bestimmt [25,29].

Spezies	Zahl der Mutationen: Aminosäuren	Zahl der Mutationen: Nucleotide
	α : β = Faktor α/β	α : β = Faktor α/β
GG - SG	3 : 1 = 3.oo	3 : 1 = 3.oo
ST - SG	16 : 5 = 3.2o	17 : 5 = 3.4o
ST - GG	15 : 4 = 3.75	16 : 4 = 4.oo
HU - ST	28 : 7 = 4.oo	38 : 7 = 5.43
HU - SG	32 : 7 = 4.71	41 : 7 = 5.87
HU - GG	3o : 6 = 5.oo	39 : 6 = 6.5o

8.3.2 Genetische Distanzen und Stammbaum

Wegen der geringen Anzahl der vorliegenden Sequenzen, kann auf eine mathematische Berechnung der genetischen Distanzen verzichtet werden.

In Abbildung 45 wird der Stammbaum der Vogelhämoglobine dargestellt. Daraus kann ersehen werden, daß sich z.B. die α-Gene des gemeinsamen Vorfahren von Strauß und Gänsen von den α-Genen des Straußes in 8 und denen der Streifengans um 9 Nucleotide unterschieden haben. Die genetische Distanz zwischen z.B. Strauß und Graugans beträgt 8 + 7 + 1 = 16.

Graugans und Streifengans stehen nach dem Stammbaum in einer ähnlichen Verwandtschaftsbeziehung wie Mensch und Rhesusaffe. Daher scheint es sehr wahrscheinlich, daß die Streifengans im Gegensatz zur heutigen Systematik eine eigene Gattung darstellt.

Weiterhin scheint der Strauß kein Urvogel oder lebendes Fossil zu sein. Er hat sich aus einem Urvogel entwickelt, von dem auch die Gänse abstammen.
Nach der Primärstruktur des Hühnerhämoglobins von MATSUDA wären Strauß und Gänse wesenlich näher verwandt, als Strauß und Huhn. Aufgrund der Vogelsystematik ist dies sehr unwahrscheinlich. Die gestrichelte Linie in Abbildung 45 gibt die Stellung des Huhnes wieder, wenn die Primärstruktur nach den Ergebnissen dieser Arbeit korrigiert wird.

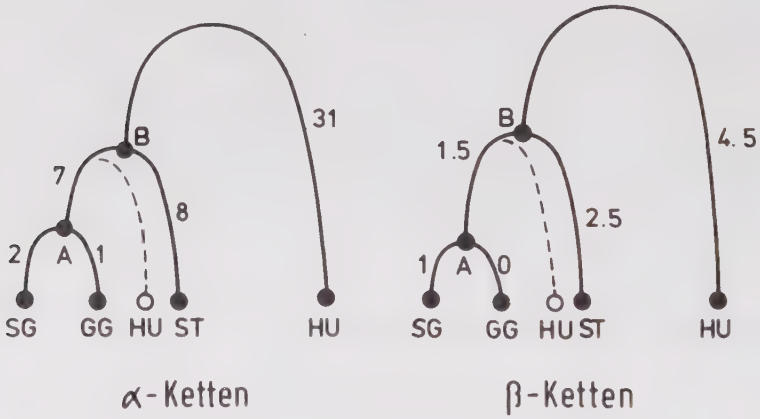


Abbildung 45
Stammbaum und genetische Distanzen der Hämoglobinketten von Graugans (GG), Streifengans (SG), Strauß (ST) und Huhn (HU). Die Zahlen geben die genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Punkten an (in Aminosäuremutationen).
A= gemeinsamer Vorfahre von SG und GG
B= gemeinsamer Vorfahre von SG, GG und ST

8.3.3 Mutationsraten und Datierung der Vorfahren

Aus den bisherigen Sequenzdaten wurde für Hämoglobine eine Mutationsrate von 6-1o Mill. Jahren [63] pro Aminosäureaustausch berechnet. Gesichert sind Daten am Hämoglobin der Primaten, wo gezeigt wurde, daß die Mutationsgeschwindigkeit in den letzten Millionen Jahren um ca. 3o % reduziert ist, d.h. die Evolution langsamer wurde [17].
Da bei den Vögeln die Ketten eine unterschiedliche Mutationsrate zeigen, stellen sich die Fragen:

1) Zeigt eine der Ketten eine normale, reduzierte und erhöhte,
2) oder zeigen beide Ketten eine unnormale Mutationsrate.

Tabelle 14

Korrelation der genetischen Distanzen (siehe Abb.45) des gemeinsamen Vorfahren der einzelnen Vogelpaare(bei homologem Vergleich der Vogelhämoglobine untereinander) mit dem Alter der gemeinsamen Vorfahren der einzelnen Vogelpaare aus paläontologischen und sonstigen Daten.
A = Anzahl der Mutationen/2 (Verteilung auf beide Äste)
B = Alter des gemeins. Vorfahren bei Mutationsrate 6 Mill.
C = " " " " " " 1o "
D = " " " " nach Paläontologie u. sonst. Daten
Zahlenangaben in Millionen Jahren

Vorfahre von	β - Ketten			α - Ketten			
	A	B	C	A	B	C	D
GG - SG	o.5	3	5	1.5	9	15	35
GG - ST	2.o	12	2o	8.o	48	8o	55-13o
ST - SG	2.5	15	25	8.5	51	85	"
HU - GG	3.o	18	3o	15.o	9o	15o	"
HU - SG	3.5	21	35	16.o	96	16o	"
HU - ST	3.5	21	35	14.o	84	14o	"

Aus Tabelle 14 ist deutlich zu ersehen:

1) Das Alter der gemeinsamen Vorfahren der Vogelpaare stimmt

bei den β-Ketten (bei der normalen für Hämoglobine gefundenen Mutationsrate, Spalte B und C, β-Ketten) nicht mit den paläontologischen und sonstigen Daten (Spalte D) überein.

2) Bei den α-Ketten der Vögel stimmen die genetischen Zeitabstände (Spalte B und C, α-Ketten) mit den paläontologischen und sonstigen Daten (Spalte D) bei Annahme einer normalen Mutationsrate etwa überein. Die Mutationsrate könnte gegebenenfalls aber auch auf einen Wert von 1o - 15 Mill. Jahren pro Austausch reduziert sein.

3) Daher ist eine genaue Datierung der Vorfahren anhand der Sequenzdaten nicht möglich.

4) Wie bei den Primaten, die auch erst in jüngerer Zeit evolvierten, wird auch bei den Gänsen im Gegensatz zu anderen Vögeln in den α-Ketten eine starke Reduktion der Mutationsrate (auf 2o - 25 Mill./Austausch) in den letzten 35 Mill. Jahren gefunden oder die Datierung mit der Entstehung des Himalayas ist falsch.

8.3.4 Deutung der reduzierten Mutationsrate der β-Ketten

Diese konservative Struktur der β-Ketten könnte durch

1) genetische oder
2) physiologische und funktionelle Faktoren

bedingt sein.

Die geringe Mutabilität der α-Ketten bei Säugern wird damit erklärt, daß die α-Ketten sowohl zu β,γ und δ-Ketten passen müssen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die β-Gene der Vögel denkbar, da bei Vogelhämoglobinen meist mehrere α-Ketten, aber nur eine β-Kette gefunden wurde. Auf physiologische Aspekte wird später noch eingegangen.

8.3.5 Die ß-Ketten der Vögel,ein Fossil ?

Aus der geringen Mutationsrate kann man schließen, daß wir heute noch in den ß-Ketten der Vögel eine Primärstruktur vorliegen haben, wie sie mit ganz geringen Abweichungen schon vor 1oo Mill. Jahren existiert haben muß. Das heißt weiterhin, daß beim sogenannten Urvogel, dem gemeinsamen Vorfahren aller Vögel, die ß-Ketten in einer fast unveränderten Form vorhanden gewesen sind. Dafür spricht auch die in Abschnitt 8.3.3.1 diskutierte spezifische Vogelstruktur. Sie wird innerhalb der verschiedenen Vogelspezies überwiegend nur an den gleichen wenigen Positionen verändert. Nach meinen Daten kann man auf einen Austausch von maximal 8 - 1o Aminosäuren vom Urvogel zu den heutigen ß-Ketten extrapolieren.

8.4 ATMUNGSPHYSIOLOGIE DER VÖGEL

Vögel haben aufgrund ihrer Fähigkeit zu fliegen und dem damit verbundenen hohen Energieumsatz einen besonders großen Bedarf an Sauerstoff. Sie zeigen in ihrem respiratorischen System viele Besonderheiten gegenüber anderen Tieren, die es ihnen ermöglichen, sehr gut Sauerstoff aufzunehmen. Die Luft gelangt beim Einatmen nach Durchströmen der nicht elastischen Lungen in die anschließenden Luftsäcke, um beim Ausatmen nochmals die Lungen zu passieren. Somit wird eine doppelte Ausnutzung des Sauerstoffgehalts ermöglicht. Die Austauschfläche der Lungen ist zehnmal größer als beim Menschen [54]. Sie besitzen ein größeres Herz (o.2 - 2.8 % des Körpergewichts), eine höhere Herzschlagfrequenz und eine höhere Körpertemperatur ($41^{o}C$) als die Säuger. Die kernhaltigen Erytrozyten sind größer und enthalten mehr Hämoglobin. Als heterotropher allosterischer Effektor des Hämoglobins wurde bei den Vögeln IPP gefunden. Nur im embryonalen Stadium wurde DPG nachgewiesen [55].

8.4.1 Atmung bei Hochlandvögeln

Wie bei Säugern und Amphibien findet man bei den in großen Höhen lebenden Vögeln eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Blutes [23] gegenüber den auf Seehöhe lebenden Vögeln.

Die Streifengans [56] ist ein Vertreter der in besonders großen Höhen lebenden und fliegenden Vögel. Sie lebt und brütet an hochgelegenen Seen (4ooo - 5ooo m) Zentralasiens und fliegt über den Himalaya zur Überwinterung nach Indien [57-59]. Dabei ist sie in Höhen über 1o ooo m beobachtet und photographiert worden [57].

BLACK et.al. [6o] berichten über Parallelversuche mit der Streifengans und der Pekingente (Anas Platyrhynchos) als Tieflandvogel in einer Unterdruckkammer. Es wurden Höhen bis 11 58o m simuliert. Bei beiden Vögeln wurde eine hohe Resistenz gegenüber hypoxischer Hypoxie gefunden, wobei sich die Streifengans als noch resistenter als die Pekingente erwies. Um den Sauerstoffbedarf decken zu können, muß die Pekingente eine Reihe von physiologischen Parametern verändern (Rechtsverschiebung der Bindungskurve, Anstieg der Hämoglobinkonzentration usw.), während bei der Streifengans nichts dergleichen beobachtet wurde.

Für die hohe Sauerstoffaffinität des Streifenganshämoglobins könnte bei gleicher Phosphatkonzentration auf der einen Seite eine Veränderung der Phosphatbindungsstellen im Hämoglobin (wie bei Lama/Kamel oder fötal/adult Mensch) oder eine Veränderung der intrinsischen Sauerstoffaffinität des Hämoglobins selbst verantwortlich sein.

8.4.2 Phosphatbindungsstellen

Die Bindungsstellen des IPP am Hämoglobin der Vögel wurden durch Röntgenanalyse des Humanhämoglobins und Vergleich mit der ß-Kettensequenz des Huhns bestimmt [61]. Es wurden mit ß135 (H13) ARG und ß139 (H17) HIS zwei Eindungsstellen mehr als bei Säugern postuliert.

Tabelle 15

Übersicht der Phosphatbindungsstellen in den ß-Ketten der Vögel. Es wird angegeben, in was für einer Position und welche Aminosäuren (deren Seitenketten die Bindung mit dem IPP eingehen) in den Helices (siehe Abkürzungen) der ß-Ketten gefunden werden.

Helix	ß-Ketten	GG	SG	ST	HU
NA1	1	VAL	VAL	VAL	VAL
NA2	2	HIS	HIS	GLN	HIS
EF6	82	LYS	LYS	LYS	LYS
H13	135	ARG	ARG	ARG	ARG
H17	139	HIS	HIS	HIS	HIS
H21	143	ARG	ARG	ARG	ARG

Wie in der Tabelle zu sehen ist, wird in allen ß-Ketten die Bindung durch gleiche Seitenketten gebildet (außer ß2 (NA2) GLN beim Strauß). Derselbe Austausch ist schon bei den ß-Ketten des Pferdehämoglobins [62] gefunden worden. Es wurde geklärt, daß der Abstand zwischen dem Amidstickstoff des Glutamins und dem Phosphatsauerstoff innerhalb der Toleranzen zur Bildung einer Bindung liegt. Dieser Austausch verändert somit die Wechselwirkung des Phosphates mit dem Hämoglobin nicht [21]. Unterschiede in der Sauerstoffaffinität der Hämoglobine dieser Vögel sind also nicht durch unterschiedliche Phosphatbindungsstellen verursacht worden.

8.4.3 Molekulare Deutung der Hochlandatmung der Streifengans

Phosphatfreies Streifenganshämoglobin zeigt nur eine geringfügig höhere Affinität als das der Graugans [24]. Durch die Anwesenheit von IPP wird dieser ursprünglich minimale Unterschied (p5o 1-2 Torr) auf die große Differenz von ca. 1o Torr verstärkt [24]. Da dieser Effekt nicht durch unterschiedliche Bindungsstellen (siehe 8.3.4) bedingt sein kann, muß man annehmen, daß die Wechselwirkung mit IPP bei Streifengans und Graugans unterschiedliche Tertiär- und Quartärstrukturveränderungen zur Folge hat.

Von den vier Unterschieden in der Primärstruktur der α- und β-Ketten von Grau- und Streifengans sind drei an Positionen, die α1β1-Dimerenkontakte bilden (Tabelle 1o). Somit könnten bei der Streifengans die β-Ketten bei Bindung des Phosphats die Strukturveränderung verschieden weitergeben. Wahrscheinlich kann aber dem Austausch α63 (E12) VAL→ALA und den damit verbundenen Änderungen der Tertiär- und Quartärstruktur (siehe 8.1.1) die Höhenatmung der Streifengans zugeschrieben werden. Genaue Aufklärung können aber erst eine Röntgenstrukturanalyse und weitere physikalisch-chemische Messungen bringen.

8.4.4 Hypoxietoleranz, Phosphatbindungsstellen und Primärstruktur

Nur die β-Ketten binden Phosphat. Bei den Vögeln sind aber im Gegensatz zu Säugern pro Hämoglobinmolekül vier Bindungsstellen mehr vorhanden. Diese größere Zahl verringert die Freiheitsgrade der Mutabilität. Das heißt, daß das Hämoglobin der Vögel in seiner Struktur nicht viel verändert werden darf, um diese starke Wechselwirkung mit IPP zu ermöglichen. Dies wäre sowohl eine Erklärung für die niedrige Mutationsrate der β-Ketten, als auch für die spezifische

Vogelstruktur und den konstanten C-terminalen Bereich beider Ketten. Im Gegensatz zum DPG bei Säugern wird das IPP an das Hämoglobin der Vögel wesentlich stärker gebunden (mehr Bindungsstellen). Daraus resultiert eine höhere Sauerstoffaffinität und somit auch die Hypoxietoleranz der Vögel.

9. MATERIAL UND METHODEN

9.1 GEWINNUNG VON GLOBIN

9.1.1 Isolierung des Hämoglobins

Das Blut wurde aus der Beinvene der Vögel entnommen (2o - 3o ml), mit Heparin versetzt und sofort verarbeitet. Das Blut wurde bei 4oooU/min zentrifugiert und die Erytrozyten nach dreimaligem Waschen (o.9 % NaCl-Lösung) im Rückstand isoliert. Das Konzentrat wurde zur Hämolyse in flüssigen Stickstoff eingetropft und nach Abgießen des Stickstoffs und Zugabe eines gleichen Volumens Wasser bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut. Nach Entfernung der Kerne und Membranen (Zentrifugation bei 4o oooU/min) wurde die Hämoglobinlösung erhalten. Die Konzentration (zwischen 2 und 1o %) wurde nach CANNAN [63] bestimmt.

9.1.2 Hämabspaltung

Nach der Methode von ROSSI-FANELLI [26] (salzsaures Aceton) wurden bessere Ergebnisse erzielt, als nach der Vorschrift von Teale [64] (Ethylmethylketon).

Bis zu 1oo ml Hämoglobinlösung wurden in 2 l Aceton (mit 2o ml konz. HCl, gekühlt auf -14° bis 18°C) unter Rühren eingetropft. Das Globin wurde abzentrifugiert und 3 x mit kaltem Aceton gewaschen. Es wurde in Wasser aufgenommen, über Nacht gegen o,1 % HAc dialysiert und lyophilisiert.

9.2 KETTENTRENNUNG

9.2.1 Gegenstromverteilung [73]

Es wurde eine 1ooo-stufige Glasapparatur (3 ml Unter-, 4 ml Oberphase, Gerät der Firma O. Post. Scientific Instruments, New York, USA) verwendet. Die Trennung erfolgte im System 1 % Dichloressigsäure/sek.-Butanol. Der Lauf wurde nach 15o Schritten abgebrochen. Die Fraktionen wurden eingeengt und nach Dialyse gegen o,1 n HAc lyophilisiert.

9.2.2 Chromatographie über CM-Cellulose [28]

Es wurde CM-Cellulose der Firma Whatman CM-52 microgranular preswollen verwendet. Die Säulendimensionen betrugen bei 1oo - 5oo mg Globin 2.5 x 12 cm, bei 1 - 3 g Globin 5.o x 15 cm. Das Globin wurde im Startpuffer (8 m Harnstoff, o,o2 m NaAc, o,2 % MCE mit HAc auf pH 5.o eingestellt) gelöst und über den Adaptor auf die Säule aufgetragen. Die Ketten wurden mit linearen Salz- und pH-Gradienten eluiert:

1. Gradient: Startpuffer + o.7 m NaCl,
2. Gradient: Startpuffer pH 5.8 + 1.2 m NaCl und
3. Gradient: Startpuffer pH 5.8 + 3.o m NaCl.

Das Elutionsvolumen betrug je nach Säulendimension o.6-2.o l. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt, nach 2 h Dialyse gegen o.1 % HAc eingeengt, über Sephadex G-25(o,1 n HAc) entsalzt und das Eluat wurde lyophilisiert.

9.3 PROTEINMODIFIZIERUNGEN

9.3.1 Oxidation mit PAS [65]

5 ml Ameisensäure wurden mit o,5 ml Perhydrol (halogenfrei) vermischt und nach 1 h bei Raumtemperatur auf $0^{o}C$ abgekühlt. Darin wurden 2oo mg Globin oder Petid gelöst und 3 h in Eiswasser inkubiert. Diese Lösung wird mit Wasser verdünnt, die überschüssige PAS abrotiert und das Protein lyophilisiert.

9.3.2 Carboximethylierung [66]

1oo mg Protein oder Peptid wurden in 1o ml 8 m Harnstoff zusammen mit 3oo mg Tris, 1o mg EDTA und o,1 ml MCE gelöst und mit HCl auf pH 8.3 eingestellt. Nach 5 h Rühren unter Stickstoff bei Zimmertemperatur wurde eine frisch bereitete Lösung von 1oo mg Jodacetamid in o,2 ml 1 n NaOH dazugegeben. Nach 1 h wurde über Sephaedex G-25(o,1 m HAc) entsalzt und das Eluat lyophilisiert.

9.3.3 Sulfonierung [88-9o]

1oo mg Protein oder Peptid wurden in 1o ml Guanidin.HCl gelöst und mit 1oo mg RI oder RII (gelöst in 1 ml 3-Dimethylamino-1-propin) versetzt. Bei $5o^{o}C$ wurde 3o min gerührt und die Lösung nach Verdünnen mit Wasser über G-25 (o.o1% NH_4OH) entsalzt und lyophilisiert.

9.3.4 Blockierung mit MSA [67,68]

2oo mg der Ketten wurden in 2o ml Guanidin.HCl gelöst und mit Triethanolamin auf pH 9.o gebracht. Unter Rühren wurden 2 g MSA (2 x umkristallisiert aus Chloroform) in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 8-1o h zugegeben. Der pH-Wert

wird mit 2.5 n NaOH auf 9.o gehalten. Die Lösung wird anschließend über Sephadex G-25 (o.1 % NH_4OH) entsalzt.

9.4 ENZYMATISCHE UND CHEMISCHE SPALTUNGEN

9.4.1 Tryptische Spaltung der α- und β-Ketten [69]

2oo mg Ketten wurden in 1o ml Wasser gelöst oder suspendiert und mit 1 n NaOH auf pH 11 eingestellt. Nach Kühlung auf 4°C wurden 4 mg TPCK-Trypsin (Fa. Merck) zugegeben und 1 h gespalten. Nach weiteren 2 h bei Zimmertemperatur wurde der pH-Wert (falls stark gesunken) auf pH 9.o korrigiert und weitere 2 mg Trypsin zugegeben. Nach weiteren 2 h wurde das CORE am IP ausgefällt und die Spaltung durch Ansäuern auf pH 3.o (HAc) gestoppt.

9.4.2 Limitiert-tryptische Spaltung der α- und β-Ketten (ARG-Spaltung) [67,68]

Nach Blockierung der Seitenketten der Lysine mit MSA wurden 2oo mg Ketten in 1o ml Wasser gelöst und mit 1 n NaOH auf pH 8.5 eingestellt. Nach Zugabe von 6 mg TPCK-Trypsin wird 4o min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde bis zur Trockene einrotiert und der Rückstand im Startpuffer der Chromatographie aufgenommen.

9.4.3 Spaltung mit Protease Aureus V8 (GLU und ASP-Spaltung) [7o]

5o mg des Peptids wurden in 2o ml Ammoniumbicarbonat pH 7.8 oder Ammoniumacetat pH 4.o gelöst (Material muß ganz gelöst sein, in Suspension keine Spaltung möglich). 2 mg des Enzyms werden hinzugegeben und die Lösung 5-5o h bei 37°C inkubiert.

Bei diesen Bedingungen wurden nur Spaltungen C-terminal von GLU erhalten.
Nach Vorschrift sollte eine gleichzeitige Spaltung von GLU und ASP in o.1 m Natriumphosphatpuffer pH (7.8)erhalten werden. In Phosphatpuffer (pH4.3) konnte aber so eine Spaltung nur bei GLU erreicht werden.

9.4.4 Spaltung mit Bromcyan [71]

Zur vollständigen Reduktion des Methionins wurden 2oo mg der Ketten in 2o ml 6m Guanidin.HCl(pH 8.o) gelöst und nach Zugabe vom 1 ml MCE 5 h unter Stickstoff inkubiert. Nach Entsalzung über Sephadex G-25 (o.1n HAc) und Gefriertrocknung wurden die Ketten in 1o ml 7o%-iger Ameisensäure gelöst, mit Stickstoff gespült und mit 1oo mg BrCN versetzt. Nach 5 h Rühren (unter Lichtausschluß) wird 3 x bis fast zur Trockene einrotiert, um das überschüssige BrCN zu entfernen. Der Rückstand wurde entweder mit Wasser verdünnt und lyophilisiert oder zur Chromatographie im Startpuffer aufgenommen.

9.4.5 Hydrolytische Spaltung der ASP-PRO-Sequenz [72]

1oo mg der Ketten wurden in 3 ml Guanidin.HCl/7o%-iger Ameisensäure gelöst und 6o h bei 41°C inkubiert. Zur Entfernung der Ameisensäure wurde 3 x mit Wasser verdünnt und bis fast zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 2-4 ml 8 m Harnstoff/1o %-iger Ameisensäure aufgenommen und chromatographiert.

9.4.6 Spaltung mit BNPS-Skatol [74]

1oo mg der β-Ketten wurden in 1o ml 6o % HAc gelöst und mit 2oo mg BNPS-Skatol versetzt. Nach 48 h wurde 3 x mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt, um das überschüssige

Reagenz zu entfernen. Nach Verdünnen mit Wasser wurde zur Trockene einrotiert und der Rückstand im Startpuffer zur Chromatographie aufgenommen.

9.5 GELCHROMATOGRAPHIE

9.5.1 Entsalzungen

Als Puffer wurden o,1 % NH_4OH, o.1 n HAc, 1 n HAc, 1o %-ige Ameisensäure (für schwer lösliche Peptide) verwendet und als Träger Sephadex G-1o (Peptide) und G-25 (Ketten, Globin). Die Säulendimensionen betrugen für Volumina bis 3oml 2.5 x 4ocm und für Volumina bis 2ooml 2.5 x 13ocm.

9.5.2 Peptidtrennungen

Nach orientierenden Vorversuchen haben sich folgende Bedingungen für die Peptidtrennungen als günstig erwiesen:

Peptide	Säulenmaterial	Dimension der Säule	mobile Phase
tryptisch	G-25	13o x 2.5 cm	o.1 n HAc o.1 Bicarbonat (pH 9)
ARG-Peptide	G-5o	13o x 2.5 "	8 m Harnstoff, o.1 m Tris, pH 8.5 (HCl)
BrCN-Peptide	G-75	13o x 2.5 "	8 m Harnstoff, 1 n HAc
TRP - Peptide	G-75	13o x 2.5 "	8 m Harnstoff, 1 n HAc
ASP-PRO-Pept.	G-5o	15o x 2.5 "	8 m Harnstoff, 1o %-ige Ameisensäure

9.6 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

9.6.1 Dowex 5o

Zur Isolierung kleiner, speziell tryptischer Peptide wurde die klassische Methode der Trennung über Dowex 5o im Pyri-

dinzyklus verwendet. Dowex 5o X2, (2oo-4oo mesh) wurde unter Erwärmung auf 4o°C in die Säule gefüllt und äquilibriert.

An mobilen Phasen wurden verwendet:

Startpuffer: Pyridinacetat pH 3.o , o.o2 - o.2 m,
Gradienten : Pyridinacetat pH 3.35, o.6 m und
Pyridinacetat pH 6.oo, 2.o m.

Die Säulendimensionen wurden zwischen o.6 x 2o cm und o.6 x 6o cm gewählt. Die Peptide wurden mit logarithmischen oder linearen Gradienten eluiert (Gesamtvolumen 4oo - 16coml).

9.6.2 Weitere Austauscher

Außer der bei der Kettentrennung beschriebenen CM-Cellulose fanden andere Träger nur am Rande Verwendung (DEAE-Sephadex A-5o, DEAE-Cellulose DE-52). Die Peptide wurden in einem Puffer aus 8 m deionisierter Harnstofflösung/o.o2 m Tris (pH 8.5, HCl) auf die Säule aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten (o.o2 - o.2 m) eluiert. Die Säulendimension betrug 1.6 x 2ocm.

9.7 ELEKTROPHORESE

9.7.1 Hochspannungspapierelektrophorese

o.o1 - o.1 µMol Peptidgemisch, gelöst in einem Volumen von 5o - 1oo µl, wurden strichförmig (1-2 cm) auf Whatmann-Papier Nr. 1 auf eine Startlinie aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 1 - 3 h (3ooo KV und 5o - 9o mA, Pyridinacetat pH 5.4) durchgeführt. Nach Trocknen wurde das Papier mit Farbreagentien besprüht und entwickelt.

Farbteste:	Ninhydrin	[75]	MET/CYS	[8o]
	TYR/HIS	[76-78]	TRP	[81]
	ARG	[79]		

Zur präparativen Trennung wurden 1 - 3 µMol (gelöst in

o.2 ml) auf eine Startlinie von 18 cm Breite aufgetragen. Nach der Trennung wurde ein Randstreifen mit Ninhydrin angefärbt und die einzelnen Zonen mit 2o % HAc eluiert.

9.7.2 Gelelektrophorese

Die Komponentenzusammensetzung der Hämoglobine wurde mit der Diskelektrophorese [25] analysiert. Es wurde ein 1o %-iges Polyacrylamid-Gel mit Tris/HCl-Puffer (pH 8.9) polimerisiert und als Kammerpuffer Tris/HCl (pH 8.3) verwendet. Die Elektrophorese wurde (mit Röhrchen und Platten) 1 - 2 h durchgeführt. Die Gele wurden entweder direkt ausgewertet oder mit 1 % Amidoschwarz 1oB angefärbt.

Die Reinheitsprüfung der isolierten Ketten wurden mit einem 5 %-igen Gel unter Zusatz von o.1 % MCE durchgeführt. Als Kammerpuffer wurde 8 m Harnstoff pH 3.5 (mit Ameisensäure) verwendet [82].

9.8 AUSWERTUNG DER TRENNUNGEN

Die Eluate wurden teilweise vor dem Sammeln in Durchflußzellen der Firmen Isco und LKB bei 28o nm vermessen. Zur nachträglichen Analyse der Fraktionen stand ein Zweistrahlspektralphotometer zur Verfügung, das eine automatische Vermessung bei verschiedenen Wellenlängen erlaubte.

9.9 AMINOSÄUREANALYSE

Unter Luftabschluß wurden 5o - 1oo nMol Protein oder Peptid in 1 - 2 ml 6 n HCl 2o h bzw. 2oo h bei 11o^{o}C hydrolysiert.

Nach Abrotieren bis zur Trockene wird der Rückstand in o.2 m Natriumcitratpuffer pH (2.2) aufgenommen. Die Analyse wurde auf einem Gerät der Firma Beckmann nach dem Zweisäulenverfahren [83] durchgeführt. Ein angeschlossener Rechner wertete die Ergebnisse aus.

9.1o N-TERMINALER AMINOSÄUREABBAU [84-86]

9.1o.1 Manuelle Endgruppenbestimmung [87]

1oo - 2oo nMol Peptid, gelöst in 1 ml Kupplungspuffer (Dimethylallylamin, Propanol, Trifluoressigsäure, pH 9.5), wurden mit 5o µl Phenylisothiocyanat 1 h bei 4o °C inkubiert (unter Stickstoff). Nach Ausschütteln mit je 2 ml Essigsäureethylester/Heptan im Verhältnis 1:1o bzw. 1:2 und Essigsäureethyl ester wurde bis zur Trockene einrotiert.Der Rückstand wurde mit je 2 ml Benzol und Essigsäureethylester gewaschen. Er wurde in 3oo µl Trifluoressigsäure gelöst und die Thiazolinone wurden bei 8o °C 3o min abgespalten und konvertiert. Die PTH-Aminosäure wurde 3 x mit je 1 ml Essigsäureethylester extrahiert und der Extrakt im Stickstoffstrom trockengeblasen. Der Rückstand wurde in 1o-2o µl Essigsäureethylester aufgenommen und identifiziert.

9.1o.2 Automatische Sequenzanalyse

Der schrittweise Abbau der Aminosäuren erfolgte in einem Beckmann Sequenator 89oB bzw. 89o C nach der Filmtechnik [85]. Die Konvertierung der einzelnen Schritte wurde von Hand durchgeführt.

Ketten, große Peptide (ab 6o Resten) und LYS-Peptide (umgesetzt mit RI[88]und RIV [89]) wurden in 1 m Quadrolpuffer [85] nach modifizierten Programmen [92] im Sequenator 89oC

abgebaut. ARG-Peptide wurden in 1m Diethylamino-1-propin-Puffer 91-93 mit doppelter Spaltung (Programm I) und ASP-PRO-Peptide mit einfacher Spaltung (Programm II) im Sequenator 89o B analysiert. Je nach Aufgabenstellung und Schrittzahl wurden zwischen o.2 - o.8 µMol Peptid oder Protein eingesetzt.

9.1o.3 Identifizierung der PTH-Aminosäuren

Die PTH-Derivate wurden auf Kieselgelplatten getüpfelt und hintereinander auf derselben Platte in 3 Systemen [93] entwickelt. Die Identifizierung erfolgte im UV-Licht (254 nm). Bei nicht eindeutiger Identifizierung wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie [94]verwendet. Zum massenspektrometrischen Nachweis von PTH-CYS und PTH-CM-CYS wurden Service-Abteilungen in Anspruch genommen.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] K.B.Reichert, Arch. Anal. Physiol. Wiss. Med.,1849, 197 (1849).

[2] N.L. Teichmann, Z. Ration: Med. (N.S.), 3, 374 (1853).

[3] W. Küster, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 82, 463 (1912).

[4] H. Fischer und K. Zeile, Just. Lieb. Annal. d. Chem., 468, 98 (1929).

[5] F. Haurowitz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 173, 118 (1928).

[6] G. Braunitzer, N. Hilschmann, V. Rudloff, K. Hilse, B. Liebold und R. Müller, Nature (London), 19o, 48o (1961).

[7] M.F. Perutz, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will und A.C.T. Worth, Nature (London), 185, 416 (196o).

[8] J.C. Kendrew, Sci. Am., 2o5, 1o4 (1961).

[9] H.S. Rhinesmith, W.A. Schroeder und L. Pauling, J. Am. Chem. Soc., 79, 4682 (1957).

[1o] G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 312, 72 (1957).

[11] E.R. Huens, F.V. Flynn, E.A. Butler und G.H. Beaven, Nature, 189, 496 (1961)

[12] G.L. Capp, D.A. Rigas und R.T. Jones, Science, 157, 65 (1967).

[13] E. Körber, Dissertation Dorpat (1866).

[14] L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer und J.C. Wells, Science, 11o, 543 (1949).

[15] H.F. Bunn, B.G. Forget und H.M. Ranney, Human Hemoglobins,Saunders Company, Philadelphia (1977).

[16] G. Braunitzer, R. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff und B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 325, 283 (1961).

[17] M.Godmann, J. Barnabas, G. Matsuda und G.W. Moore, Nature(London), 233, 6o4 (1962).

[18] S. Rapoport und G.M. Guest, J. Biol. Chem., 138, 269 (1941).

[19] L. Johnson und M.E. Tate, Can. J. Chem., 47, 63 (1969).

[2o] J. Greenwald, J. Biol. Chem., 63, 339 (1925).

[21] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Stangl und C. Bauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 547 (1978).

[22] F.G. Hall, D.B. Dill und E.S. Guzmann Barron, J. Cell. Comp. Physiol., 8, 3o1 (1936).

[23] D. Sturkie und A. Abati in Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 68 (1978).

[24] D. Petschow, I. Würdinger, R. Baumann, J. Duhm, G. Braunitzer und C. Bauer, J. Appl. Physiol., 42, 139 (1977).

[25] L. Ornstein, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321 (1964).

[26] A. Rossi-Fanelli, E. Antonini und A. Caputo, Biochim. Biophys. Acta, 3o, 6o8 (1958).

[27] G. Matsuda, H. Takei, K.C. Wu und T. Shiozawa, Int. J. Prot. Res., 3, 173 (1971).

[28] J.B. Clegg, M.A. Naughton und D.J. Weatherall, J. Mol. Biol., 19, 91 (1966).

[29] W. Fitch und E. Margoliash, Science, 155, 279 (1974).

[3o] G. Fermi, J. Mol. Biol., 97, 237 (1975).

[31] persönliche Mitteilung von M.F. Perutz (1979).

[32] A. Arnone, Nature(London), 237, 146 (1972).

[33] G. Matsuda, T. Maita, K. Mizuno und H. Ota, Nature (London) New Biol., 244, 244 (1973).

[34] D. Debouverie, Biochim., 57, 569 (1975).

[35] G. Matsuda und H. Takei, J. Biochem, 54, 156 (1963).

[36] M.O. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, Nat. Biomed. Res. Foumd.(Silver Spring), 5, 2 (1976).

[37] G. Braunitzer, B. Liebold, R. Müller und V. Rudloff, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 32o, 17o (196o).

[38] E. Zuckerkandl, Sci. Am., 212, 11o (1965).
[39] V.M. Ingram, Nature (London), 189, 7o4 (1961).
[4o] G.P. Smith, Cold Spring Harour Symp. Quant. Biol., 38, 5o7 (1973).
[41] G.O. Smith, Science, 191, 528 (1976).
[42] H.G. Keyl, Experimentia, 21, 191 (1965).
[43] W.M. Fitch und C.H. Caugley in Molekular Anthropologie, Plenum Press (New York, London), 158 (1975).
[44] M. Goodman, G.W. Moore, J. Barnabas und G. Matsuda, J. Molec. Evol., 3, 1 (1974).
[45] G. Braunitzer, Scientia, 1o7, 189 (1972).
[46] W.M. Fitch, Syt. Zool., 2o, 4o6 (1971).
[47] G. W. Moore, J. Barnabas und M. Goodman, J. Theor. Biol., 38, 459 (1973).
[48] V. Ziswiler, Spezielle Zoologie der Wirbeltiere, 2, Amniotica (1976).
[49] B. Grzimek in Grzimek's Tierleben, 1-3 (Vögel), Kingler Verlag Zürich (1976).
[5o] M. Goodman in Molekular Anthropologie, Plenum Press (New York, London), 321 (1975).
[51] I. Würdinger persönliche Mitteilung (1979).
[52] G. Braunitzer und W. Oberthür, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 36o, 669 (1979).
[53] E. Zuckerkandl und L. Pauling in Horizons of Biochem., Academic Press (New York), 189 (1962).
[54] H.R. Dunker in Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic, Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York, 52 (1978).
[55] T.A. Borgese und L.M. Lampert, Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 822 (1975).
[56] I. Würdinger, Int. Zoo Yearbook, 13, 116 (1973)
[57] L.W. Swan, Nat. Hist., 7o, 68 (197o).
[58] A. Kydyraliew, Ornitologija, 8, 245 (1967).
[59] S.A. Ali und S.D. Ripley, Handbook of Birds, 1, Oxford University Press (1968).

[6o] C.P. Black, S.M. Tenney und M. van Kroonenburg in Respiratory Funktion in Birds, Adult and Embryonic, Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York),79 (1978).

[61] A. Arnone und M.F. Perutz, Nature (London), 249, 34 (1974).

[62] G. Braunitzer, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 312, 72 (1958).

[63] R.K. Cannan, Science, 127, 1376 (1958).

[64] F.W.J. Teale, Biochim. Biophys. Acta, 35, 543 (1959).

[65] F. Sanger, Biochem. J., 44, 126 (1949).

[66] F.R.N. Gurd in Meth. in Enzym., 25, 311 (1973).

[67] H. Fritz, E. Fink, M. Gebhard, K. Hochstrasser und E. Werl, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 35o, 933 (1969).

[68] D. Kowalski und H.I. Laskowski, Biochem, 11, 3451 (1972).

[69] C.H.W. Hirs, Meth. Enzymol., 11, 218 (1967).

[7o] J. Houmard und G.R. Drapeau, Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 35o6 (1972).

[71] E. Gross und B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc., 83, 151o (1961).

[72] J. Jauregui-Adell und J. Marti, J. Annal. Biochem., 69, 35o6 (1975).

[73] R.J. Hill und L.C. Craig, J. Am. Chem. Soc., 81, 2272 (1959).

[74] G.S. Omenn, A. Fontana und C.B. Anfinsen, J. Biol. Chem., 245, 1895 (197o).

[75] R.A. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. Chim. Acta, 44, 2o22 (1961).

[76] H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 42, 517 (19o4).

[77] H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 94, 288 (1915).

[78] H. Frank und H. Petersen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 299, 1 (1955).

[79] A.J. Gottlieb und H.A. Itano, J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 4o5 (1963).

[8o] H.M. Winnegard, G. Toennies und R.J. Block, Science, 1o8, 5o6 (1948).
[81] C.E. Dagliesh, Biochem. J., 52, 3 (1952).
[82] W.K. Kenneth und A. Riggs, J. of Biol. Chem., 25o, 5934 (1975).
[83] P.H. Spackmann, W.H. Stein und S. Moore, Annal. Chem., 3o, 119o (1958).
[84] P. Edman, Acta Chem. Scand., 4, 277 (195o).
[85] P. Edman und G. Begg, Eur. J. Biochem., 1, 8o (1967).
[86] P. Edman und A. Henschen in Protein Sequence Determination (Needleman ed.) 2nd ed., 229 (1975).
[87] J. Söjquist, Arki Kemi, 16, 425 (196o).
[88] G. Braunitzer, B. Schrank und A. Ruhfus, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 1589 (197o).
[89] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Ruhfus, S. Petersen und U. Petersen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 173o (1971).
[9o] G. Braunitzer, R. Chen, B. Schrank und A. Stangl, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 832 (1972).
[91] G. Braunitzer und B. Schrank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 415 (197o).
[92] G. Braunitzer und B. Schrank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 417 (197o).
[93] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Stangl und U. Scheithauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 137 (1978).
[94] C.L. Zimmermann und J. Pisano, Meth. Enzymol., 57, 45 (1977).

Lebenslauf

Oberthür Walter, 8051 Kranzberg, Asterstraße 9
geb. am 15.4.1946 in Erlangen, verheiratet
Vater: Oberthür Karl-Heinz, ev. Pfarrer
zur Zeit in 8082 Grafrath, Kornfeldstraße 8

1952-1956	Volksschule in Geiselhöring bei Straubing 1. - 4. Klasse
1956-1957	Hum. Gymnasium Straubing 5. Klasse
1957-1959	Hum. Gymnasium München 5. - 6. Klasse
1959-1966	Musisches Gymnasium Freising 7. - 13. Klasse
1966	Abitur in Freising
1967	Beginn des Chemiestudiums im SS 1967 an der Lud. Max. Universität München
1970	Vordiplom im WS 1969/70 in München
1973	Mündliche Diplomchemiker-Hauptprüfung am 23.3.1973 in München
1976	Heirat mit Lieselotte Brinski am 9.6.1976
1976-1977	Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried von September 1976 bis Mai 1977
1977	Geburt meines Sohnes Felix am 21.11.1977
1977	Beginn Medizinstudium an der Universität München neben der Promotion WS 1977/1978
1977-1979	Dissertation über "Primärstruktur der Hämoglobine von Graugans (Anser anser), Streifengans (Anser indicus) und Strauß (Struthio camelus). Ein Beitrag zur Evolution und Physiologie (Hochlandatmung) der Vögel." am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Braunitzer und am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. W. Voelter von Mai 1977 bis November 1979

Meine akademischen Lehrer waren:

Beck, Becker, Behringer, Bock, Brandmüller, Braunitzer, Böhm, Bücher, Cleve, Dickel, Dingler, Faessler, Frick, Gerlach, Gompper, Goßner, Hebel, Holländer, Huisgen, Hebel, Klingenberg, Kühn, Nagorsen, Paetzold, Pöppel, Range, Saller, Sauer, Schmidpeter, Schmidt, Schubert, Schwab, Ullmann, Vahrenkamp, Voelter, Weigel, Weiss, Wetzstein, Wiberg, Wille, Wolf, Zundel.